



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

ANNAMARIA DÓRIA SOUZA VIDOTTI

**CULTIVO HETEROTRÓFICO AXÊNICO DE *Chlorella*  
*vulgaris*: INIBIÇÃO POR SUBSTRATO**

***AXENIC HETEROTROPHIC CULTIVATION OF Chlorella*  
*vulgaris*: SUBSTRATE INHIBITION**

Campinas

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

ANNAMARIA DÓRIA SOUZA VIDOTTI

**CULTIVO HETEROTRÓFICO AXÊNICO DE *Chlorella vulgaris*:  
INIBIÇÃO POR SUBSTRATO**

Orientador Prof. Dr. Telma Teixeira Franco

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Unicamp para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química na área de Desenvolvimento de Processos Químicos.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, defendida pela aluna Annamaria Dória Souza Vidotti, e orientada pela Prof. Dr. Telma Teixeira Franco.

Profª. Drª. Telma Teixeira Franco (Orientadora)

Campinas

2012

V669c      Vidotti, Annamaria Dória Souza  
Cultivo heterotrófico axênico de *Chlorella vulgaris*:  
inibição por substrato / Annamaria Dória Souza Vidotti.  
--Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Telma Teixeira Franco.  
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microalga. 2. Glicose. I. Franco, Telma Teixeira,  
1957-. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

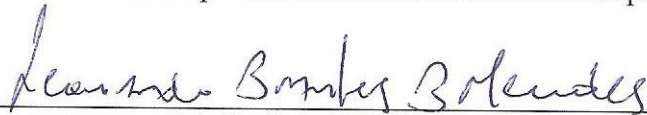
Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: 26 de junho de 2012.



---

Profª. Dra. Telma Teixeira Franco (Orientadora)  
Unicamp - Universidade Estadual de Campinas



---

Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes  
Petrobrás



---

Dr. Fernando Rodrigo Frederico  
Unicamp - Universidade Estadual de Campinas

Campinas

2012

*Dedico a meus Pais, Fábria e Evandro*

*A minha avó Dedê*

*A meu marido Antonio Carlos*

*Com muito carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade, força e permissão de mais esta conquista.

A meus pais Evandro e Fábria, e a minha avó Dedê. Não tenho nem palavras para agradecer, somente a consciência da luta e dedicação de vocês pela minha educação. Essa conquista não é só minha, é nossa!

Aos meus amados irmãos Letícia e Pedro, a minha tia Lec, e primos Júlia e Túlio, pela torcida, força e carinho de sempre.

A meus queridos sogros Carmen e Carlos, cunhados Consuelo e Fraklin, e avó Maria Luiza pelo incentivo e carinho sempre presentes.

Ao meu “namorado” Tony, meu anjo da guarda, meu suporte, pelo apoio incondicional.

A minha orientadora Profa. Dr<sup>a</sup>. Telma Franco, pelo apoio, pela oportunidade me dada e por sua excelente orientação.

Aos queridos amigos Jaiver, Vinícius, Edison, Bianca, Michelle, Sérgio, Giselle, Talita, Olga, aos amigos do grupo Petrobrás, Lucy, Liliana, Renato, Mônica, Lucas Maretti, Lucas Gomes, Carol e Diego e todo o grupo LEBBPOR, pelo companheirismo, pela ótima convivência no dia a dia no laboratório e pelos momentos de descontração e amizade.

Aos membros da banca, Leonardo Bacellar e Fernando Frederico, por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Ao CNPQ e Petrobrás pelo apoio financeiro.

A UNICAMP e a Faculdade de Engenharia Química pela oportunidade.

O meu muito obrigado a todos envolvidos nessa jornada.

*“Na vida, não vale tanto o que temos,  
nem tanto importa o que somos.  
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e,  
acima de tudo, importa o que fazemos de nós.”*

***Chico Xavier***

## RESUMO

Vidotti, A. D. S. *Cultivo heterotrófico axênico de Chlorella vulgaris: inibição por substrato*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. 114p. Dissertação (Mestrado).

Rotas heterotróficas a partir de microalgas apresentam ganhos significativos de produtividade em biomassa quando comparadas aos sistemas fotossintéticos convencionais, estando a glicose e o acetato entre as fontes de carbono mais comuns desse tipo de cultivo. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver cultivos heterotróficos axênicos para a microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando a glicose e o acetato de sódio como fontes de carbono exógeno, avaliando o efeito de inibição por substrato, bem como a modelagem dos perfis de crescimento de biomassa e consumo de substrato. A influência da concentração inicial de substrato na produção de biomassa pela *C. vulgaris* foi investigada, sendo obtidas cinéticas de crescimento do microrganismo submetido a concentrações iniciais de glicose entre 2 e 100 g.L<sup>-1</sup>, e de acetato de sódio, entre 2 e 20 g.L<sup>-1</sup>. Foi verificado que a concentração inicial de substrato influenciou significativamente o rendimento celular final, e que apesar dos dois substratos avaliados terem se mostrado fontes de carbono adequadas, a utilização de maiores concentrações iniciais, 100 g.L<sup>-1</sup> e 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e acetato de sódio, respectivamente, acarretaram na inibição do crescimento da *C. vulgaris*. Os modelos matemáticos testados representaram adequadamente a cinética de inibição, sendo que os resultados indicaram que a concentração ótima de glicose para o cultivo heterotrófico da *C. vulgaris* foi  $5,8 \pm 0,3$  g.L<sup>-1</sup> e de acetato de sódio foi  $3,5 \pm 0,2$  g.L<sup>-1</sup>. Os resultados evidenciaram ainda que os procedimentos adotados no controle da contaminação foram efetivos para a manutenção da axenia dos cultivos. Pela comparação do desempenho cinético, foi constatada uma superioridade (maior que 50%) da glicose como substrato em comparação com o acetato de sódio. E no estudo de aumento de produtividade de biomassa para cultivos com acetato, foi obtido um aumento de 70% neste parâmetro com a batelada alimentada, e uma concentração final de biomassa 2,5 vezes maior do que a melhor concentração celular alcançada em shaker.

**Palavras chave:** microalga, cultivo heterotrófico, glicose, acetato de sódio e inibição por substrato.



## ABSTRACT

Vidotti, A. D. S. *Axenic heterotrophic cultivation of Chlorella vulgaris: substrate inhibition*. Campinas: Department of Chemical Engineering, University of Campinas, 2012. 114 p. Thesis (Master's Degree).

Heterotrophic microalgal routes show significant productivity gains in biomass when compared with the conventional photosynthetic systems, being glucose and acetate among the most common carbon sources such in this kind of cultivation. In this context the objective of this study was to develop axenic cultures for heterotrophic microalgae *Chlorella vulgaris* using glucose and sodium acetate as exogenous carbon sources, evaluating the effect of substrate inhibition, as well as the modeling of the biomass growth profiles and substrate consumption. The influence of the initial substrate concentration in the biomass production by *C. vulgaris* was investigated, being obtained kinetics growth of the microorganism subjected to initial glucose concentrations between 2 and 100 g/L<sup>-1</sup>, and sodium acetate between 2 and 20 g/L<sup>-1</sup>. It was found that the initial substrate concentration significantly affected the final cell yield and that although the two have been shown to be tested substrates carbon sources suitable, the use of larger initial concentrations of 100 and 20 g.L<sup>-1</sup> of glucose and sodium acetate, respectively, resulted in inhibiting the growth of *C. vulgaris*. The mathematical models tested represented adequately the kinetics of inhibition, and the results indicated that the optimum concentration of glucose to heterotrophic cultivation of *C. vulgaris* is  $5,8 \pm 0,3$  g.L<sup>-1</sup> and for the sodium acetate this value is  $3,5 \pm 0,2$  g.L<sup>-1</sup>. The results showed also that the procedures used in contamination control have been effective for the maintenance of the axenic of crops. By comparing the performance, kinetic superiority was observed (more than 50%) for the systems using glucose as substrate in comparison with the systems using sodium acetate. Finally, in the study of increasing of productivity of biomass for crops with acetate, was obtained a 70% increase in this parameter with the fed batch operation, and a final biomass concentration 2.5 times greater than the best cell concentration achieved in shake flasks.

**Keywords:** microalgae, heterotrophic culture, glucose, sodium acetate and substrate inhibition.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	3
1.2.1. <i>Objetivo geral</i> .....	3
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	3
1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	3
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1. MICROALGAS.....	6
2.2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS.....	7
2.2.1. <i>Produção de óleos por biomassas microbianas (single-cell oils)</i> .....	9
2.2.2. <i>Uso de microalgas para produção de biodiesel</i> .....	11
2.3. CULTIVO DE MICROALGAS.....	12
2.4. FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS .....	16
2.4.1. <i>Chlorella</i> .....	16
2.4.2. <i>Glicose e acetato de sódio como fontes de carbono orgânico</i> .....	17
2.4.3. <i>Inibição por substrato</i> .....	18
2.4.4. <i>Razão carbono/nitrogênio (C/N)</i> .....	19
2.4.5. <i>Contaminação</i> .....	19
2.5. CINÉTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS .....	19
2.6. MODELAGEM MATEMÁTICA DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....	21
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
3. ESTUDOS DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO PARA CULTIVO HETEROTRÓFICO AXÊNICO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> UTILIZANDO GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO .....	33
3.1. RESUMO.....	33
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.2.1. <i>Meio de cultivo</i> .....	34
<i>“A concentração de nitrato de sódio varia com a concentração de glicose no meio, de acordo com a relação C/N=20. ....</i>	34
3.2.2. <i>Microrganismo</i> .....	34
3.2.3. <i>Preparo do inóculo</i> .....	34
3.2.4. <i>Condições de cultivo</i> .....	35
3.2.5. <i>Controle da axenia dos cultivos</i> .....	36
3.2.6. <i>Cálculos dos parâmetros cinéticos</i> .....	36
3.2.7. <i>Métodos analíticos</i> .....	37
3.2.7.1. <i>Determinação do pH</i> .....	37
3.2.7.2. <i>Determinação da concentração celular</i> .....	37

3.2.7.3.	<i>Determinação da concentração de glicose</i> .....	37
3.2.7.4.	<i>Determinação da concentração de nitrogênio total</i> .....	38
3.2.8.	<i>Modelos matemáticos</i> .....	38
3.2.8.1.	<i>Modelos de crescimento celular</i> .....	38
3.2.8.2.	<i>Modelos de consumo de substrato</i> .....	39
3.2.8.3.	<i>Resolução dos modelos</i> .....	39
3.2.8.4.	<i>Avaliação dos modelos</i> .....	39
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
3.3.1.	<i>Modelos matemáticos</i> .....	49
3.3.1.1.	<i>Modelos de crescimento celular</i> .....	49
3.3.1.2.	<i>Modelos de consumo de substrato</i> .....	54
3.4.	CONCLUSÕES.....	58
3.5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
4.	ESTUDOS DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO PARA CULTIVO HETEROTRÓFICO AXÊNICO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> UTILIZANDO ACETATO DE SÓDIO COMO FONTE DE CARBONO .....	61
4.1.	RESUMO.....	61
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	62
4.2.1.	<i>Meio de cultivo</i> .....	62
4.2.2.	<i>Microrganismo</i> .....	62
4.2.3.	<i>Preparo do inóculo</i> .....	62
4.2.4.	<i>Condições de cultivo</i> .....	62
4.2.5.	<i>Controle da axenia dos cultivos</i> .....	62
4.2.6.	<i>Cálculos dos parâmetros cinéticos</i> .....	63
4.2.7.	<i>Métodos analíticos</i> .....	63
4.2.7.1.	<i>Determinação do pH</i> .....	63
4.2.7.2.	<i>Determinação da concentração celular</i> .....	63
4.2.7.3.	<i>Determinação da concentração de acetato de sódio</i> .....	63
4.2.7.4.	<i>Determinação da concentração de nitrogênio total</i> .....	64
4.2.7.5.	<i>Determinação do teor de lipídios</i> .....	64
4.2.7.5.1.	<i>Digestão ácida</i> .....	64
4.2.7.5.2.	<i>Extração de lipídios</i> .....	64
4.2.8.	<i>Modelos matemáticos</i> .....	65
4.2.9.	<i>Resultados e discussão</i> .....	65
4.2.10.	<i>Cultivos em shaker</i> .....	65
4.3.2.	<i>Modelos matemáticos</i> .....	74
4.3.2.1.	<i>Modelos de crescimento celular</i> .....	74
4.3.2.2.	<i>Modelos de consumo de substrato</i> .....	77
4.3.	CONCLUSÕES.....	80
4.4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

5. COMPARAÇÃO CINÉTICA DOS CULTIVOS COM GLICOSE E ACETATO DE SÓDIO E AUMENTO DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA UTILIZANDO PROCESSO DE BATELADA ALIMENTADA.....	82
5.1. RESUMO.....	82
5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	83
5.2.1. <i>Comparação dos cultivos com glicose e acetato de sódio</i> .....	83
5.2.2. <i>Condições experimentais do fermentador</i> .....	83
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
5.3.1. <i>Comparação dos cultivos com glicose e acetato de sódio</i> .....	83
5.3.2. <i>Aumento de produtividade de biomassa em fermentador</i> .....	86
5.4. CONCLUSÕES.....	89
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	90
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	91
8. APÊNDICE .....	92
8.1. MEIOS DE CULTIVO .....	92
8.2. MODELOS MATEMÁTICOS.....	93
8.2.1. <i>Modelo Andrews (Equação)</i> .....	93
8.2.2. <i>Modelo Haldane (Equação)</i> .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 2.

FIGURA 2.1. POSSIBILIDADES DE GERAÇÃO DE ENERGIA COM BIOMASSA DE MICROALGAS. O PRODUTO PRINCIPAL DE CADA PROCESSO É MOSTRADO NO FINAL DO PERCURSO DA TRANSFORMAÇÃO (ADAPTADA DE WANG <i>ET AL.</i> , 2008 E SUALI E SARBATLY, 2012).....	8
FIGURA 2.2. PRODUÇÃO DE <i>SPIRULINA</i> EM TANQUES DE CULTIVO ABERTOS. (FONTE: A- WWW.NATURLAND.DE/ORGANICMICROALGAE.HTML;B.WWW.FAZENDATAMANDUA.COM. BR/JT-JAN 2011.HTM).....	13
FIGURA 2.3. FOTOBIOREACTORES (FONTE: A-WWW.PITTSTATE.EDU/DEPARTMENT/BIOLOGY/ BIONEWS/NEWSLETTER_2010/DAWSON_2010.DOT;B.EARTHSKY.ORG/HUMAN.WORLD/BI OFUEL-PRODUCTION-HAS-POTENTIAL-IN-U-S-SOUTHWEST). ....	14
FIGURA 2.4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE MICROALGAS CULTIVADAS EM BATELADA. SENDO: CONCENTRAÇÃO CELULAR (LINHA SÓLIDA) E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (LINHA TRACEJADA) (ADAPTADA DE MATA <i>ET AL.</i> , 2010).....	20
FIGURA 2. 5. CURVAS TÍPICAS DOS MODELOS DE CONSUMO CONSIDERANDO LIMITAÇÃO (FIGURA DA ESQUERDA) E INIBIÇÃO (FIGURA DA DIREITA) PELO SUBSTRATO. ....	27

### Capítulo 3.

FIGURA 3.1. PREPARO DO INÓCULO.....	35
FIGURA 3.2. PERFIL DE PH DOS ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE GLICOSE.....	42
FIGURA 3.3. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR (-■-), CONSUMO DE GLICOSE (-●-) E CONSUMO DE NITRATO (-▲-) DOS ENSAIOS REALIZADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE GLICOSE.....	43
FIGURA 3.4. COMPARAÇÃO EM FORMA GRÁFICA DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS. SENDO: A. $X_{MÁX}$ (DENSIDADE CELULAR MÁXIMA); B. $TX_{MÁX}$ (TEMPO DE RESIDÊNCIA CELULAR PARA A OBTENÇÃO DA DENSIDADE CELULAR MÁXIMA); C. $\mu_{MÁX}$ (VELOCIDADE MÁXIMA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO); D. $TG$ (TEMPO DE GERAÇÃO); E. $P_{MÁX}$ (PRODUTIVIDADE CELULAR MÁXIMA) E F. $Y_{X/S}$ (RENDIMENTO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS).....	46
FIGURA 3.5. VERIFICAÇÃO DA AXENIA POR ANÁLISE VISUAL EM MICROSCÓPIO ( <i>C. VULGARIS</i> CPCC 90 - AUMENTO DE 100X).....	49
FIGURA 3.6. AJUSTE DOS MODELOS DE CRESCIMENTO CELULAR AOS DADOS EXPERIMENTAIS. SEND: (- - -) LO, (...) GM E (○) DADOS EXPERIMENTAIS. ....	50
FIGURA 3.7. COMPARAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS $X_{MÁX}$ , $\mu_{MÁX}$ E $TG$ CALCULADOS PELOS MODELOS LO E GM E OS OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE PARA AS SETE CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE AVALIADAS. SENDO: (- - -) LO, (...) GM E (○) DADOS EXPERIMENTAIS. ....	53
FIGURA 3.8. AJUSTE DOS MODELOS DE CONSUMO DE SUBSTRATO LIMITANTE E INIBIDOR AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE GLICOSE (— MODELO; ○ EXPERIMENTAL).....	55
FIGURA 3.9. AJUSTE DO MODELO ANDREWS AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE GLICOSE (— MODELO; ● EXPERIMENTAL). ....	57

## Capítulo 4.

FIGURA 4.1. PERFIS DE PH DOS ENSAIOS REALIZADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE ACETATO. ....	66
FIGURA 4.2. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR (-■-), CONSUMO DE ACETATO (-●-) E CONSUMO DE NITRATO (-▲-) DOS ENSAIOS REALIZADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE ACETATO. ....	67
FIGURA 4.3. COMPARAÇÃO EM FORMA GRÁFICA DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS. SENDO: A. $X_{MÁX}$ (DENSIDADE CELULAR MÁXIMA); B. $TX_{MÁX}$ (TEMPO DE RESIDÊNCIA CELULAR PARA A OBTENÇÃO DA DENSIDADE CELULAR MÁXIMA); C. $\mu_{MÁX}$ (VELOCIDADE MÁXIMA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO); D. $TG$ (TEMPO DE GERAÇÃO); E. $P_{MÁX}$ (PRODUTIVIDADE CELULAR MÁXIMA) E F. $Y_{X/S}$ (RENDIMENTO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS). ....	70
FIGURA 4.4. AJUSTE DOS MODELOS DE CRESCIMENTO CELULAR AOS DADOS EXPERIMENTAIS. SENDO: (- - -) LO, (...) GM E (o) DADOS EXPERIMENTAIS. ....	74
FIGURA 4.5. COMPARAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS $X_{MÁX}$ , $\mu_{MÁX}$ E $TG$ CALCULADOS PELOS MODELOS LO E GM E OS OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE PARA AS SEIS CONCENTRAÇÕES DE ACETATO AVALIADAS. SENDO: (- - -) LO, (...) GM E (o) DADOS EXPERIMENTAIS. ....	76
FIGURA 4.6. AJUSTE DOS MODELOS DE CONSUMO DE SUBSTRATO LIMITANTE E INIBIDOR AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE ACETATO (— MODELO; o EXPERIMENTAL). ....	78
FIGURA 4. 7. AJUSTE DO MODELO ANDREWS AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE ACETATO, EVIDENCIANDO OS PARÂMETROS PREDITOS PELO MODELO ( — MODELO; ● EXPERIMENTAL). ....	79

## Capítulo 5.

FIGURA 5.1. COMPARAÇÃO EM FORMA GRÁFICA DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS. A. $X_{MÁX}$ ; B. $T_{MÁX}$ ; C. $\mu_{MÁX}$ ; D. $TG$ ; E. $P_{MÁX}$ ; F. $PH_{MÁX}$ ; G. $Y_{X/S}$ (‘■’ GLICOSE; ‘■’ ACETATO). ....	84
FIGURA 5. 2. PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR DO PRIMEIRO ENSAIO REALIZADO EM FERMENTADOR (-●-) E EM SHAKER (-□-). AS BARRAS DE ERRO REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS VALORES PARA CADA PONTO DE RETIRADA DE AMOSTRA. ....	87
FIGURA 5.3. PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR DO SEGUNDO ENSAIO REALIZADO EM FERMENTADOR (-●-) E EM SHAKER (-□-). AS BARRAS DE ERRO REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS VALORES PARA CADA PONTO DE RETIRADA DE AMOSTRA. ....	87
FIGURA 5. 4. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR (-●-), PH(-▲-) E CONSUMO DE SUBSTRATO (-■-). AS BARRAS DE ERRO REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS VALORES PARA CADA PONTO DE RETIRADA DE AMOSTRA. ....	88

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo 2.

TABELA 2.1. CONTEÚDO E PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS (ADAPTADA DE MATA <i>ET AL.</i> , 2010).	10
TABELA 2.2. COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS FECHADOS (FOTOBIOREATORES) E SISTEMAS ABERTOS PARA A PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA DE MICROALGAS (ADAPTADA DE MATA <i>ET AL.</i> , 2010).	15
TABELA 2.3. MODELOS DE CRESCIMENTO CELULAR.	23
TABELA 2.4. MODELOS DE CONSUMO DE SUBSTRATO.	25
TABELA 2.5. MODELOS DE CONSUMO DE SUBSTRATO (SUBSTRATO INIBIDOR).	26

### Capítulo 3.

TABELA 3.1. COMPOSIÇÃO DO MEIO SINTÉTICO BBM MODIFICADO - PH 6.8.	34
TABELA 3.2. PARÂMETROS CINÉTICOS AVALIADOS.	36
TABELA 3.3. MODELOS DE CRESCIMENTO CELULAR.	38
TABELA 3.4. MODELOS DE CONSUMO DE SUBSTRATO – 1 SUBSTRATO LIMITANTE E INIBIDOR.	39
TABELA 3.5. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DOS MODELOS.	40
TABELA 3.6. ANÁLISE COMPARATIVA DO DESEMPENHO DOS CULTIVOS COM INÓCULO CONTROLADO E NÃO CONTROLADO.	40
TABELA 3.7. PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO CELULAR DOS CULTIVOS REALIZADOS COM GLICOSE.	45
TABELA 3.8. COMPARAÇÃO DE CULTIVO HETEROTRÓFICO COM <i>C. VULGARIS</i> UTILIZANDO GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO.	48
TABELA 3.9. RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO.	52
TABELA 3.10. DESVIOS ABSOLUTOS ENTRE OS VALORES DE $X_{MÁX}$ , $\mu_{MÁX}$ , E TG EXPERIMENTAIS E CALCULADOS PELOS MODELOS LO E GM.	54
TABELA 3.11. RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO.	56
TABELA 3.12. PARÂMETROS OBTIDOS PELOS MODELOS ANDREWS E HALDANE.	56

### Capítulo 4.

TABELA 4.1. PARÂMETROS CINÉTICOS AVALIADOS.	63
TABELA 4.2. PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO CELULAR DOS CULTIVOS REALIZADOS.	69
TABELA 4.3. ESTUDOS EM CULTIVO HETEROTRÓFICO COM <i>C. VULGARIS</i> UTILIZANDO ACETATO DE SÓDIO COMO FONTE DE CARBONO.	72
TABELA 4.4. RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO.	75
TABELA 4.5. DESVIOS ABSOLUTOS ENTRE OS VALORES DE $X_{MÁX}$ , $\mu_{MÁX}$ , E TG EXPERIMENTAIS E CALCULADOS PELOS MODELOS LO E GM.	77
TABELA 4.6. RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO.	79

## **Capítulo 5.**

TABELA 5.1. RESULTADOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS AVALIADOS. ....	89
---	----



## NOMENCLATURA

Símbolo	Nome	Unidade
A	Parâmetro de ajuste do modelo	-
B	Crescimento relativo no tempo t	$h^{-1}$
C	$\ln (X_{\max}/X_0)$	-
$K_i$	Constante de inibição por substrato	$g.L^{-1}$
$K_s$	Constante de saturação de Monod	$g.L^{-1}$
M	Tempo em que a taxa de crescimento é máxima	h
$P_x$	Produtividade celular	$g.L^{-1}.d^{-1}$
$P_{x\_máx}$	Produtividade máxima volumétrica de biomassa	$g.L^{-1}.d^{-1}$
$R^2$	Quadrado do coeficiente de correlação	-
S	Concentração de substrato	$g.L^{-1}$
t	Tempo	d
tg	Tempo de geração	d
$t_{x\max}$	Tempo para atingir a concentração máxima de biomassa	D
$v$	Parâmetro p/ representação da curvatura do modelo	-
X	Concentração de biomassa	$g.L^{-1}$
$X_{\max}$	Concentração celular máxima	$g.L^{-1}$
$X_s$	Conversão global de substrato	%
Y	$\ln X_t/X_0$	-
$Y_{L/S}$	Rendimento lipídio/substrato	$g_L.g_S^{-1}$
$Y_{X/S}$	Rendimento biomassa/substrato	$g_X.g_S^{-1}$

<b>Símbolos gregos</b>	<b>Nome</b>	<b>Unidade</b>
$\lambda$	Duração da fase lag	d <sup>-1</sup>
$\mu$	Velocidade específica de crescimento	d <sup>-1</sup>
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade máxima específica de crescimento	d <sup>-1</sup>

#### **Abreviaturas   Nome**

%SEP	Erro padrão de predição
Abs	Absorbância
A <sub>f</sub>	Fator de exatidão
B&D	Bligh & Dyer
B <sub>f</sub>	Fator Bias
C/N	Razão carbono/nitrogênio
GM	Gompertz Modificado
lag	latência
LO	Logístico
ppm	Partes por milhão
RMSE	Erro médio quadrático
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultra violeta
v/v	Relação volume/volume
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto

#### **Subscritos   Nome**

L	Lipídio
máx	Máximo valor atingido
S	Substrato
X	Biomassa

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Introdução

Atualmente o processo mais comum para o cultivo de microalgas é o crescimento autotrófico, pois as mesmas são fotossintetizantes e muitas apresentam elevada eficiência na conversão da energia solar. Nesse processo as microalgas são cultivadas na iluminação de ambientes naturais ou artificiais, porém, o aumento de luz para promover um maior crescimento é o principal limitante para este tipo de cultivo (Chen e Johns, 1994; Richmond, 2004).

Grandes tanques abertos ao ar livre são os sistemas a mais tempo utilizados em indústrias de cultivos autotróficos de microalga. Este sistema apresenta algumas desvantagens: (i) a distribuição de luz diminui com a profundidade, em consequência disso, o tanque precisa ser muito raso, o que acarreta num volume pequeno em relação à área construída; (ii) por serem sistemas abertos, problemas de contaminação biológica podem ocorrer; (iii) os parâmetros de crescimento do cultivo dependem das condições climáticas locais e (iv) a separação da biomassa do meio de cultivo é cara e limitada pelas baixas densidades celulares (Suali e Sarbatly, 2012; Chen e Chen, 2006; Chisti, 2007).

Tais dificuldades ainda hoje existentes limitam a plena exploração industrial de células de microalgas. A fim de resolver os problemas inerentes ao sistema de tanques abertos, fotobiorreatores fechados estão sendo utilizados (Lee, 2001; Perez-Garcia *et al.*, 2010).

Entretanto, fotobiorreatores de conceito semelhante ao de tanques abertos, ou seja, baseados no crescimento fotossintético, ainda possuem alguns inconvenientes se construídos em grande escala, dentre os principais problemas: volumes superiores impossibilitam a dispersão de luz de forma eficiente e uniforme e desenvolvimento de biofilme de algas na superfície limitando a penetração de luz no fotobiorreator (Perez-Garcia *et al.*, 2010).

Nesse sentido o cultivo heterotrófico em biorreatores convencionais, construídos em material não transparente pode ser adotado em processos de grande

escala. O metabolismo heterotrófico de microalgas é uma rota específica na qual estes organismos crescem no escuro, suportados por uma fonte exógena de carbono orgânico, substituindo o tradicional aporte de dióxido de carbono e energia luminosa em condições fotossintéticas.

Tecnologicamente, o emprego deste tipo de rota metabólica supera algumas limitações de engenharia relacionadas ao fornecimento de energia luminosa. E independente das questões relativas ao desenvolvimento do processo, rotas heterotróficas a partir de microalgas representam ganhos de produtividade em biomassa significativamente superiores quando comparados aos sistemas fotossintéticos convencionais (Xu *et al.*, 2006; Miao e Wu, 2006; Xiong *et al.*, 2008; Yeh *et al.*, 2012).

O cultivo heterotrófico axênico além de permitir maiores densidades celulares, viabiliza a produção de produtos farmacêuticos e alimentares (Malcata, 2011; Mata *et al.*, 2010). Assim o desenvolvimento de processos de cultivo com base no metabolismo heterotrófico de microalgas é atualmente considerado um emergente campo da biotecnologia industrial.

Dentre as fontes de carbono mais utilizadas em cultivos heterotróficos a partir de microalgas descritas na literatura, estão a glicose e o acetato de sódio, porém, de uma forma geral, os dados indicam apenas a faixa de concentração inicial dos substratos e o respectivo aumento da densidade celular para diferentes cepas de *Chlorella* (Yeh *et al.*, 2012). Além disso, altas concentrações de substrato podem inibir o crescimento da microalga, na verdade, inibição pelo substrato é um dos principais problemas que impedem elevadas densidades celulares de microalgas em culturas heterotróficas (Chen e Johns, 1995; Perez-Garcia *et al.*, 2010).

Diante disso, estudos de inibição por substrato são necessários para estabelecer a concentração de substrato ideal necessária para proporcionar maiores crescimento e produtividade.

## **1.2.Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo geral**

Desenvolver cultivos heterotróficos axênicos de microalgas utilizando glicose e acetato de sódio como fontes de carbono orgânico para a microalga *Chlorella vulgaris*, avaliando o efeito de inibição por substrato, bem como a modelagem dos perfis de crescimento de biomassa e consumo de substrato.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar estratégias para realização de cultivos axênicos de microalgas;
- ✓ Estudar a influência da concentração inicial de glicose e acetato de sódio na produção de biomassa por *Chlorella vulgaris*;
- ✓ Verificar o efeito de inibição por substrato sobre os cultivos heterotróficos estudados;
- ✓ Avaliar o uso dos modelos Logístico e Gompertz Modificado para a representação do crescimento celular;
- ✓ Avaliar o uso dos modelos de Andrews e de Haldane para a representação do consumo de substrato;
- ✓ Determinar as melhores concentrações de glicose e acetato de sódio para o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris*.
- ✓ Comparar o desempenho dos cultivos utilizando glicose e acetato de sódio como fontes de carbono;
- ✓ Estudar o aumento de produtividade de biomassa pelo processo de batelada alimentada com acetato de sódio como substrato.

## **1.3. Estrutura da dissertação**

A dissertação foi subdividida em capítulos com o intuito de facilitar a compreensão dos resultados obtidos. O capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica acerca do cultivo de microalgas, de seu potencial biotecnológico, do crescimento heterotrófico e dos principais fatores que o afetam, ainda acerca de processos fermentativos e sua modelagem.

O capítulo 3 apresenta o estudo dos cultivos com glicose como fonte de carbono, bem como a modelagem do crescimento celular e consumo de substrato desses cultivos.

O capítulo 4 aborda o estudo dos cultivos com acetato de sódio como fonte de carbono, bem como a modelagem do crescimento celular e consumo de substrato desses cultivos.

O capítulo 5 compara o desempenho dos cultivos com glicose e acetato de sódio como substrato no cultivo heterotrófico da *C. vulgaris*. Ainda neste capítulo é estudado o aumento da produtividade de biomassa em batelada alimentada com acetato de sódio.

O Capítulo 6 traz as conclusões gerais obtidas neste trabalho, o capítulo 7 traz as sugestões para trabalhos futuros na área e o capítulo 8 traz o apêndice.

#### **1.4. Referências Bibliográficas**

Chen, F., Johns, M. R. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. *Journal of Applied Phycology*, v.7, p.43-46, 1995.

Chen, F., Johns, M. R. Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. *Process Biochemistry*, v.29, p.245-252, 1994.

Chen, G., Chen, F. Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters*, v.28, p.607-616, 2006.

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv*, v.25, p.294-306, 2007.

Lee, Y. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, v.13, p.307-315, 2001.

Malcata, F. X. Microalgae and biofuels: A promising partnership? *Trends in Biotechnology*, v.29, n.11, p.542-549, 2011.

Mata, T. M., Antonio, A. M., Nídia S. C. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustainable Energy*, v.14, p.217-232, 2010.

Miao, X., Wu, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, v.97, p.841-846, 2006.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Basahn, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, v.45, p.11-36, 2010.

Richmond, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Sciences Ltd, 2004.

Suali, E. Sabartly, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.4316-4342, 2012.

Xiong, W., Li, X. F., Xiang, J. Y., Wu, Q. Y. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbial-diesel production. *Appl. Microbiol Biotechnol*, v.78, p.29-36, 2008.

Xu, H., Miao, X. L., Wu, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal Biotechnol*, v.126, p.499-507. 2006.

Yeh, K. L., Chen, C. Y., Chang, J. S. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Journal Biochem. Engineering*, 2012. doi:10.1016/j.bej.2012.02.006.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Microalgas

De acordo com Li *et al.* (2008), microalgas são todos os microrganismos fotossintetizantes procarióticos e eucarióticos que apresentam altas taxas de crescimento e eficiência fotossintética devido a sua simples estrutura celular. As cianobactérias (*Cyanophyceae*) são exemplos de microrganismos procarióticos e as algas verdes (*Chlorophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*) são exemplos de microrganismos eucarióticos.

Microalgas estão entre os seres vivos mais antigos do planeta e são encontradas no mundo todo, estando distribuídas principalmente nas águas, em oceanos, rios e lagos, e na superfície de alguns tipos de solo. A grande maioria é de vida livre, porém, certo número de microalgas vive em associação simbiótica com uma variedade de outros microrganismos (Mata *et al.*, 2010). Esta ampla distribuição geográfica reflete a grande variedade de espécies, e a surpreendente tolerância a ambientes extremos e condições adversas (Richmond, 2004).

É estimado que existam mais de 50 mil espécies de microalgas, das quais aproximadamente 30 mil foram estudadas. O cultivo de microalgas é estudado e praticado a mais de 100 anos, o desenvolvimento de métodos de cultivo de microalgas foi iniciado no final do século XIX, entre 1870 e 1880 (Richmond, 2004).

Os primeiros estudos de cultivo de microalgas, durante os primeiros 25-30 anos, utilizaram espécies que apresentavam bom crescimento em meios enriquecidos apenas com nutrientes minerais (nitrogênio, fósforo, e sais minerais diversos usados em cultivos hidropônicos), esses resultados fizeram com que se acreditasse que todas as microalgas eram estritamente autotróficas. Entretanto, apesar de serem tipicamente autotróficas, algumas espécies de microalgas podem viver no escuro utilizando fontes orgânicas de carbono como fonte de energia, o que caracteriza o crescimento heterotrófico (Lourenço, 2006).

Dentre vários outros pesquisadores da área, Ernst Georg Pringshein em 1912 publicou o seu primeiro de muitos trabalhos sobre cultivo de microalgas, ele realizou



inúmeros trabalhos de isolamento de microalgas e trabalhou também com cultivos utilizando fontes orgânicas, iniciando daí avanços no campo da nutrição heterotrófica. Ele mostrou já nesta época, que várias espécies eram capazes de crescer no escuro com acetato (Lourenço, 2006).

O uso de microalgas em processos de mitigação ambiental e produção de biomassa foram sugeridos há muitos anos (Becker, 1994). A habilidade destes organismos em degradar compostos poluentes associados à formação de uma biomassa com importantes características comerciais tem sido avaliada amplamente ao longo dos anos (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

O primeiro cultivo em grande escala de microalga ocorreu no início dos anos 1960 no Japão pela Nihon Chlorella com uma cultura de *Chlorella*. Já em 1970 o interesse no uso de microalgas para energia renovável aumentou por conta da primeira crise do petróleo (Spolaore *et al.*, 2006).

O cultivo de microalgas continua sendo muito estudado atualmente, pela enorme variedade de possibilidades de aplicações e potenciais produtos provenientes deste tipo de cultivo (Suali e Sarbatly, 2012).

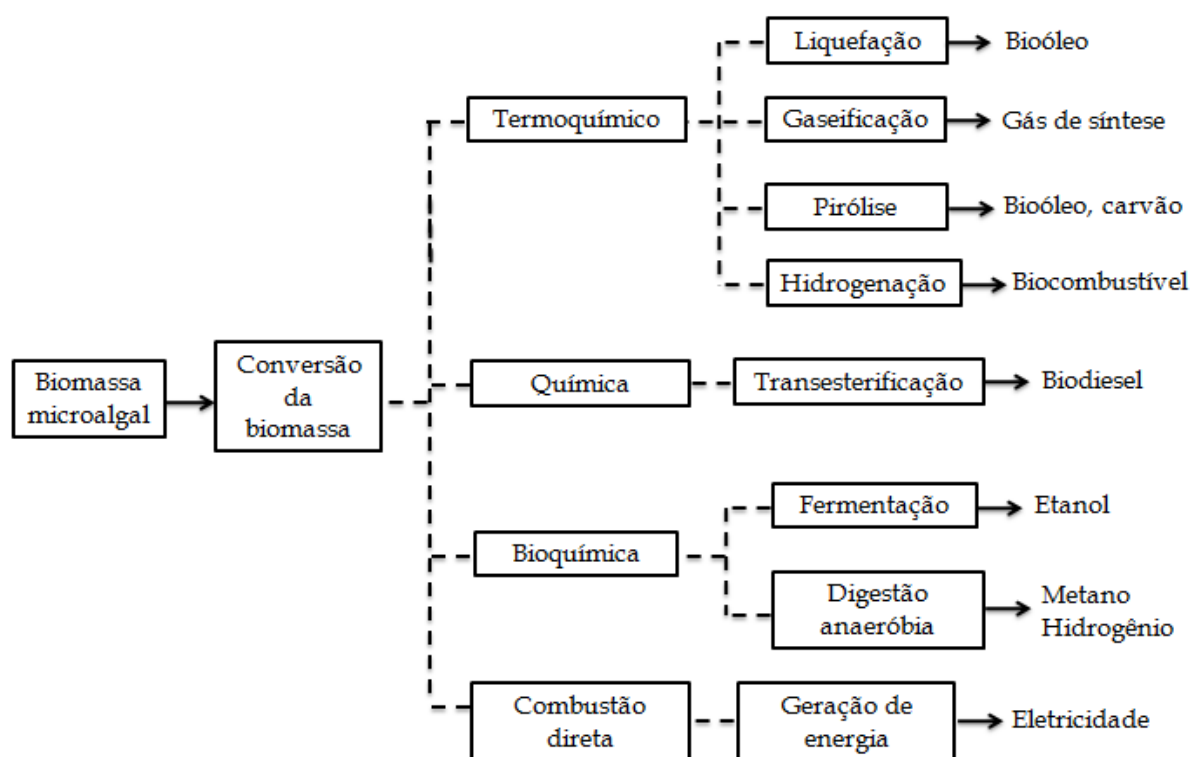
## **2.2. Potencial biotecnológico das microalgas**

A principal motivação para o cultivo comercial de microalgas é a produção de produtos de interesse comercial. A aplicação mais simples e popular de microalgas compreende seu uso na alimentação de animais, que é uma das formas mais antigas de seu uso (Lourenço, 2006).

Outras aplicações incluem: suplementos alimentares para seres humanos, principalmente encapsulados ricos em proteínas e vitaminas; extração de substâncias de importância farmacêutica; lipídios, enzimas, biomassa, polímeros, toxinas, pigmentos etc.; produção de cosméticos; biocombustíveis ou a utilização das microalgas em processos ambientais, como o tratamento de efluentes, fertilização dos solos, fitorremediação de resíduos tóxicos (Muñoz e Guieysse, 2006; Becker, 1994; Lourenço, 2006 e Perez-Garcia *et al.*, 2010; Mata *et al.*, 2010; Chen e Chen, 2006).

Microalgas podem produzir vários tipos de biocombustíveis: o metano, produzido por digestão anaeróbia da biomassa, o biohidrogênio, produzido fotobiologicamente, além do biodiesel produzido do óleo de microalgas (Spolaore *et al.*, 2006; Chisti, 2007). Um esquema da transformação de microalgas em energia é mostrado na Figura 2.1.

Além da utilização de microalgas na produção de biocombustíveis, outras possibilidades incluem: após a extração do óleo, a biomassa resultante pode ser processada em alimentação para gado, fertilizante orgânico ou simplesmente queimada para co-geração de energia (eletricidade e calor) (Mata *et al.*, 2010).



**Figura 2.1.** Possibilidades de geração de energia com biomassa de microalgas. O produto principal de cada processo é mostrado no final do percurso da transformação (adaptada de Wang *et al.*, 2008 e Suali e Sarbatly, 2012).

### 2.2.1. Produção de óleos por biomassas microbianas (*single-cell oils*)

Denominam-se lipídeos microbianos as gorduras e/ou óleos produzidos biotecnologicamente usando microalgas, fungos filamentosos e leveduras. Os triglicerídeos são os principais componentes lipídicos encontrados nestes microrganismos. Single-cell oil (SCO) são os lipídeos, particularmente os triglicérides, produzidos microbiologicamente (Meng *et al.*, 2009).

Dentro da ampla diversidade microbiana, as microalgas apresentam-se como uma classe de microrganismos com potencial de exploração para fins de produção de óleos, uma vez que são capazes de acumular substanciais concentrações de lipídios no interior da célula (Malcata, 2011). O conteúdo médio de lipídios nas células de algas varia entre 1% e 70% do seu peso seco (Meng *et al.*, 2009; Spolaore *et al.*, 2006).

As cepas também podem ser geneticamente modificadas a fim de produzir o tipo de ácido graxo desejado, tornando-as ainda mais promissoras como matéria prima (Perez-Garcia *et al.*, 2010). Além disso, o teor de óleo de algumas cepas de microalgas cultivadas em condições heterotróficas pode chegar a uma produtividade de óleo superior a produtividade de vegetais oleaginosos utilizados comercialmente (Malcata, 2011; Amaro *et al.*, 2011).

A Tabela 2.1 traz o teor e produtividade de lipídios de diferentes espécies de microalgas marinhas e de água doce (Mata *et al.*, 2010), mostrando diferenças significativas entre as várias espécies.

O maior conteúdo de óleo ocorre na *Botryococcus braunii* (75% em peso de biomassa seca), porém a produtividade associada é baixa. As microalgas mais estudadas na literatura, tais como a *Chlorella*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nanno-chloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum* e *Porphyridium spp.*, possuem níveis de óleo variando entre 20 e 50%, porém maiores produtividades podem ser alcançadas (Mata *et al.*, 2010).

No atual estado tecnológico, o alto custo de produção dos SCO é a maior barreira para sua comercialização, no entanto a produção dos SCO para fins nutricionais (ácidos graxos poliinsaturados) já é viável economicamente (Meng *et al.*,

2009). Da mesma forma que, para a maioria dos processos de produção biotecnológica de compostos químicos de elevado volume de produção (*bulk chemicals*), o maior impacto no custo de produção é devido ao custo da matéria prima, este também é o caso dos lipídeos produzidos por microalgas. Sendo assim, apenas com o uso de matérias primas de baixo custo, disponíveis em grandes volumes, a produção de SCO com fins industriais será uma realidade (Perez-Garcia *et al.*, 2010).

**Tabela 2.1.** Conteúdo e produtividade de lipídios de diferentes espécies de microalgas (adaptada de Mata *et al.*, 2010).

<b>Espécies</b>	<b>Teor de lipídios (%)</b>	<b>Produtividade lipídica (mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>
<i>Botryococcus spp.</i>	25,0 – 75,0	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6 – 39,8	17,6
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 – 63,0	10,3 – 50,0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6 – 57,8	1214
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0 – 22,0	44,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0	11,2 – 40,0
<i>Chlorella spp.</i>	10,0 – 57,0	18,7 – 42,1
<i>Chlorococcum spp.</i>	19,3	53,7
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-
<i>Dunaliella salina</i>	6,0 – 25,0	116,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7 – 71,0	-
<i>Dunaliella spp.</i>	17,5 – 67,0	33,5
<i>Ellipsoidion spp.</i>	27,4	47,3
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25,0	-
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0 – 40,0	-
<i>Isochrysis spp.</i>	7,1 – 33,0	37,8
<i>Nannochloris spp.</i>	20,0 – 56,0	60,9 – 76,5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7 – 29,7	84,0 – 142,0
<i>Nannochloropsis spp.</i>	12,0 – 53,0	60,9 – 76,5
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0 – 65,0	90,0 – 134,0
<i>Pavlova salina</i>	30,9	49,4
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	40,2
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0 – 57,0	44,8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0 – 55,0	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9 – 18,4	35,1
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6 – 21,1	40,8 – 53,9
<i>Spirulina platensis</i>	4,0 – 16,6	-

### 2.2.2. Uso de microalgas para produção de biodiesel

O aumento da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera terrestre, principalmente o CO<sub>2</sub> formado na queima de combustíveis fósseis, e os temores relativos ao impacto do aquecimento global sobre o equilíbrio climático do planeta, têm levado a substituição de combustíveis fósseis por fontes energéticas sustentáveis e mais limpas como os biocombustíveis (Hill *et al.*, 2006).

O Biodiesel é um biocombustível, substituto do óleo diesel fóssil fabricado a partir de óleo vegetal, óleo residual de fritura, gordura animal ou lipídio microbiano, que apresenta desempenho igual ao do diesel fóssil, porém com menores emissões de material particulado, monóxido de carbono, hidrocarbonetos e óxidos de enxofre (Meng *et al.*, 2009).

Atualmente a produção de biodiesel depende principalmente de óleos vegetais, tais como óleo de soja, girassol, mamona, palma, entre outros, como também, porém em bem menor quantidade, de gordura animal e óleo residual de fritura (Chisti, 2007; Perez-Garcia *et al.*, 2010). No entanto, críticas referentes ao uso de fontes alimentícias para a fabricação de agro-combustíveis (Chisti, 2008), além da necessidade de terras férteis e possível expansão da fronteira agrícola para áreas de preservação ambiental, tem sido frequentemente descritos como inconvenientes desta estratégia (Pousa *et al.*, 2007).

Como a produtividade de óleo de muitas microalgas excede a produtividade de óleo dos vegetais oleaginosos, pesquisas têm dado especial atenção à biomassa de microalgas (Suali e Sarbatly, 2012; Mata *et al.*, 2010). O cultivo de microalgas não é sazonal, não necessita de terras agricultáveis e exige menor área de cultivo (Chisti, 2008), além disso, a transformação do óleo de microalgas em biodiesel utiliza a tecnologia atualmente disponível, a transesterificação (Chisti, 2007). Diante disso, a produção de biodiesel de microalgas tem sido bastante discutida na literatura (Suali e Sarbatly, 2012; Chisti, 2008).

### 2.3. Cultivo de microalgas

Algumas espécies de microalgas podem alterar o tipo de metabolismo como uma resposta às mudanças nas condições ambientais. De acordo com Mata *et al.*, (2010) o cultivo pode ser:

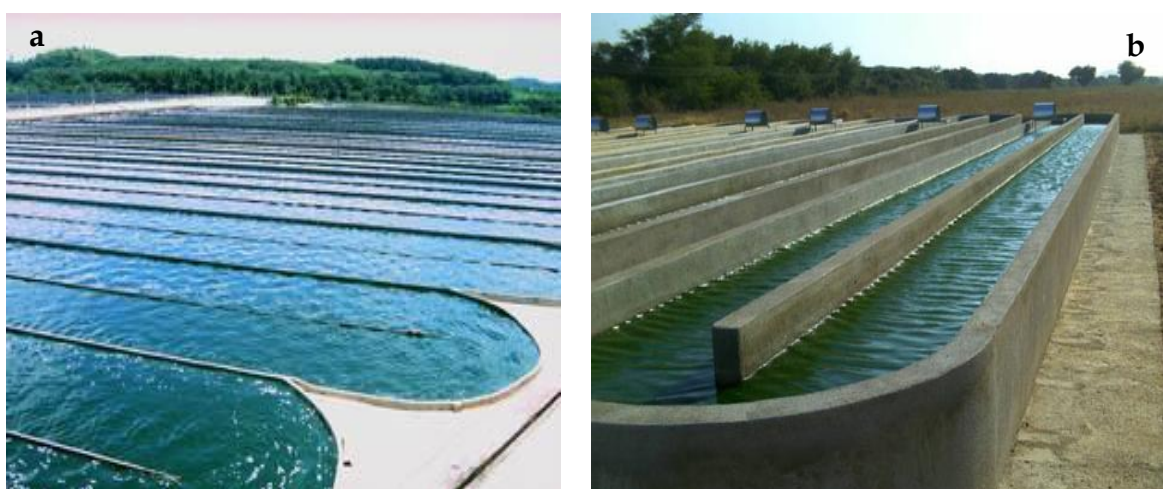
- ✓ autotrófico, quando a luz é usada como única fonte de energia, sendo convertida em energia química através da fotossíntese;
- ✓ heterotrófico, quando somente compostos orgânicos são usados como fonte de carbono e energia;
- ✓ mixotrófico, quando tanto o metabolismo autotrófico quanto o heterotrófico podem ser usados dependendo da concentração de compostos orgânicos e da intensidade de luz disponíveis e
- ✓ fotoheterotrófico, quando a luz é requerida para desencadear o uso de compostos orgânicos como fonte de carbono (também conhecido como fotoorganotrofia, fotoassimilação e fotometabolismo).

Atualmente o processo mais comum para o cultivo de microalgas é o crescimento autotrófico (Perez-Garcia *et al.*, 2010). Como todas as microalgas são fotossintetizantes, e muitas são eficientes conversoras de energia solar, as microalgas são normalmente cultivadas na iluminação de ambientes naturais ou artificialmente.

Portanto, tal como é praticada com outras espécies microbianas, tanques abertos (lagoas) que imitam ambientes naturais de microalgas são os mais utilizados para cultivo em massa.

Grandes tanques abertos ao ar livre (Figura 2.2) são os sistemas a mais tempo utilizados em indústrias de cultivos de microalga (Richmond, 2004), por possuir custos de construção e operação mais baixos. Esses tanques abertos podem ser construídos de vidro, plástico, concreto, tijolo ou até mesmo terra compactada em uma variedade de formas e tamanhos. A mais comum é o tanque em forma de pista, uma forma oval que se assemelha a um circuito de corrida de carros (Becker, 1994; Lee, 2001; Chisti, 2007). Outra vantagem desse sistema de tanques abertos é que podem ser construídos em áreas degradadas e de terras não férteis (Chen, 1996).

Porém este sistema apresenta algumas desvantagens: (i) a distribuição de luz diminui com a profundidade, em consequência disso, o tanque precisa ser muito raso, o que acarreta num volume pequeno em relação à área construída; (ii) por serem sistemas abertos, problemas de contaminação biológica podem ocorrer; (iii) os parâmetros de crescimento do cultivo dependem das condições climáticas locais e (iv) a separação da biomassa do meio de cultivo é cara e limitada pelas baixas densidades celulares (Suali e Sarbatly, 2012; Chen e Chen, 2006; Chisti, 2007).

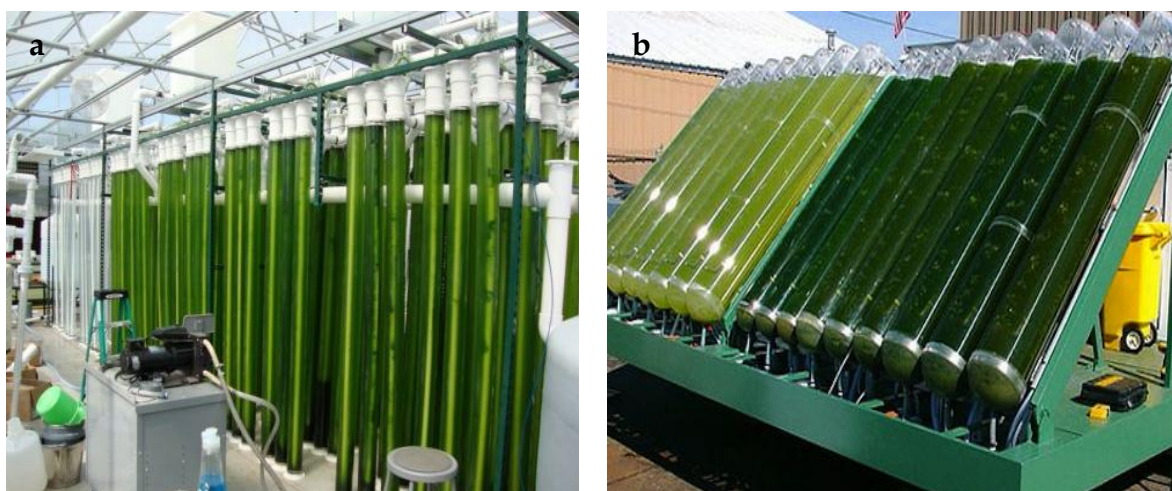


**Figura 2.2.** Produção de *Spirulina* em tanques de cultivo abertos. (Fonte: a-[www.naturland.de/organicmicroalgae.html](http://www.naturland.de/organicmicroalgae.html); b-[www.fazendatamandua.com.br/jt-jan-2011.htm](http://www.fazendatamandua.com.br/jt-jan-2011.htm)).

Tais dificuldades ainda hoje existentes limitam a plena exploração industrial de células de microalgas.

A fim de resolver os problemas inerentes ao sistema de tanques abertos, fotobiorreatores fechados (Figura 2.3) estão sendo utilizados (Lee, 2001). Eles podem reduzir os custos de produção de biomassa através da modelagem do fotobiorreator, controle dos parâmetros durante o cultivo (Li, 2008), controle operacional para superar limitações de velocidade de crescimento, tais como pH, temperatura e difusão de gás, eles ainda evitam evaporação e permitem atingir concentrações celulares e produtividades volumétricas mais elevadas. Porém a principal vantagem do

fotobiorreator é evitar contaminação biológica, tornando possível a monocultura (Suali e Sarbatly, 2012).



**Figura 2.3.** Fotobiorreatores (Fonte: a-[www.pittstate.edu/departament/biology/bionews/newsletter\\_2010/dawson\\_2010.dot](http://www.pittstate.edu/departament/biology/bionews/newsletter_2010/dawson_2010.dot); b- [earthsky.org/human-world/biofuel-production-has-potential-in-u-s-southwest](http://earthsky.org/human-world/biofuel-production-has-potential-in-u-s-southwest)).

Entretanto, fotobiorreatores de conceito semelhante ao de tanques a céu aberto, ainda possuem alguns inconvenientes se construídos em grande escala, dentre os principais problemas: dispersão de luz de forma eficiente e uniforme, desenvolvimento de biofilme de algas na superfície limitando a penetração de luz no fotobiorreator e altos custos de construção e operação (Perez-Garcia *et al.*, 2010). A Tabela 2.2 apresenta uma comparação entre os fotobiorreatores e os sistemas abertos de cultivo em relação a diversas condições e parâmetros de cultivo.

No cultivo autotrófico o aumento na introdução de luz natural ou artificial para aumentar o crescimento das microalgas é justamente o principal fator limitante para este tipo de cultivo (Suali e Sarbatly, 2012). Assim, o crescimento heterotrófico pode ser uma alternativa viável de baixo custo para o crescimento fotoautotrófico (Perez-Garcia *et al.*, 2010; Richmond, 2004). Pois, apesar do cultivo autotrófico ser o mais utilizado para microalgas (Malcata, 2011), várias espécies também podem crescer heterotroficamente (Chen e Johns, 1994; Xu *et al.*, 2006), assimilando uma grande



variedade de fontes de carbono orgânico, evitando assim os problemas de limitação de luz (Huang *et al.*, 2010).

**Tabela 2.2.** Comparação entre sistemas fechados (fotobiorreatores) e sistemas abertos para a produção em larga escala de microalgas (adaptada de Mata *et al.*, 2010).

Sistemas de cultivo	Sistemas fechados	Sistemas abertos
Controle de contaminação	Possível	Difícil
Risco de contaminação	Reduzido	Alto
Axenia	Possível	Difícil
Controle do processo	Possível	Difícil
Mistura	Uniforme	Pobre
Área/volume	Alto	Baixo
Concentração de células	Alta	Baixa
Investimento	Alto	Baixo
Custos de operação	Alto	Baixo
Eficiência da utilização de luz	Alta	Pobre
Controle da temperatura	Mais uniforme	Difícil
Produtividade	3 a 5 vezes mais produtivo	Pobre
Espaço requerido	Depende da produtividade	Equivalente
Estresse hidrodinâmico	Médio	Muito baixo
Evaporação do meio de cultivo	Baixa	Alta
Controle da transferência de gás	Alta	Baixa

O metabolismo heterotrófico de microalgas é uma rota específica na qual estes organismos crescem no escuro, suportados por uma fonte exógena de carbono orgânico, substituindo o tradicional aporte de dióxido de carbono e energia luminosa em condições fotossintéticas. Tecnicamente, o emprego deste tipo de rota metabólica supera algumas limitações de engenharia relacionadas ao fornecimento de energia luminosa, que complica significativamente a configuração do biorreator (Suali e Sarbatly, 2012).

Eliminando a necessidade de luz, esta modalidade de cultivo oferece a possibilidade de aumentar significativamente a densidade celular e a produtividade

da cultura (Chen e Johns, 1994). Ainda acerca das vantagens do crescimento heterotrófico, esta configuração pode: permitir a utilização de praticamente qualquer fermentador como biorreator, como os já utilizados para a produção industrial de medicamentos, bebidas, aditivos alimentares etc., e permitir a utilização de efluentes ou fontes de carbono industriais residuais, e até mesmo o desenvolvimento de meios de cultivo ideais e mais específicos para cada espécie (Gladue e Maxey, 1994; Malcata, 2011).

Mas duas limitações importantes para microalgas no cultivo heterotrófico são: aumento significativo de problemas de contaminação, pela concorrência com outros microrganismos, bactérias, fungos e leveduras, cujo crescimento é reforçado em culturas heterotróficas justamente pela presença do substrato orgânico no meio de cultivo; e o fato de que algumas espécies podem não ser capazes de consumir certos compostos orgânicos ou sofrerem inibição do crescimento pelo excesso deste (Chen e Johns, 1994; Chen, 1996).

#### **2.4. Fatores que influenciam o crescimento heterotrófico de microalgas**

Existem vários fatores que influenciam o crescimento celular no cultivo heterotrófico de microalgas: cepa utilizada, concentração de nutrientes, principalmente da fonte orgânica de carbono, temperatura, O<sub>2</sub>, pH, salinidade, presença de compostos tóxicos, problemas de contaminação por fungos, bactérias, leveduras e microalgas, modo de operação do biorreator, o cisalhamento ocasionado pela agitação, a taxa de diluição, entre outros (Chen e Chen, 2006; Mata *et al.*, 2010). Serão discutidos os principais fatores para o presente trabalho:

##### **2.4.1. *Chlorella***

Chen e Chen (2006) enumeram as características que geralmente uma microalga utilizada em cultivos heterotróficos deve possuir: (i) a capacidade de dividir e metabolizar no escuro; (ii) a capacidade de crescer em meios de cultivo com substrato orgânico de baixo custo e facilmente esterilizáveis; (iii) a capacidade de se adaptar rapidamente a um novo ambiente (por exemplo, não possuir ou possuir curta fase lag, quando inoculada em meio fresco) e (iv) a capacidade de suportar tensões e

cisalhamento por conta da hidrodinâmica ou equipamentos periféricos de biorreatores.

Várias espécies de microalgas têm demonstrado a capacidade de utilizar açúcares ou outros compostos orgânicos no escuro (Chen e Johns, 1994; Shi *et al.*, 1999). A *Chlorella vulgaris*, já em 1994 foi testada por Gladue e Maxey (1994) que testaram 121 diferentes cepas de microalgas e constataram que 57 dessas foram capazes de crescer em regime heterotrófico, dentre essas 57 estava a *Chlorella vulgaris* 3010.

Trabalhos mais recentes na área de cultivo heterotrófico continuam utilizando a *Chlorella sp.*, por exemplo, de-Bashan e colaboradores em 2008 afirmaram em seu estudo que a *Chlorella sp.* possui a capacidade de crescer no escuro, se suplementada com carbono e energia a partir de uma fonte orgânica de carbono. Heredia-Arroyo *et al.* (2011) e Yeh *et al.* (2012) enfatizam que a *Chlorella sp.* alcança bons rendimentos em biomassa sob condições heterotróficas. Outros autores afirmam ainda que, suas taxas de crescimento são mais altas sob condições heterotróficas do que sob condições autotróficas (Liang *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2000).

Heredia-Arroyo *et al.* (2011) afirmam que a *C. vulgaris* é uma cepa com potencial para ser uma excelente produtora de óleo, devido à sua alta capacidade de acumular lipídios e alta taxa de crescimento que pode ser estimulada com adição de materiais orgânicos e Liang *et al.* (2009) acrescenta ainda acerca da robustez desse microrganismo.

#### **2.4.2. Glicose e acetato de sódio como fontes de carbono orgânico**

Na maioria dos estudos com a *Chlorella*, a glicose e o acetato de sódio tem sido os mais utilizados como fonte de carbono orgânico em cultivos heterotróficos e mixotróficos. (Bumbak, 2011). A glicose é uma das fontes de carbono mais comuns, sendo utilizada em cultivos heterotróficos ou mixotróficos seja em escala industrial ou laboratorial (Suali e Sarbatly, 2012).

No cultivo heterotrófico de microalgas, o custo da fonte de carbono é um dos problemas mais discutidos, que pode dificultar o sucesso dessa técnica. Assim, os

substratos precisam ser de baixo custo ou até mesmo resíduos disponíveis como fonte de carbono para tornar a alternativa viável (Suali e Sarbatly, 2012).

Acetato é um substrato prontamente disponível e de baixo custo, pois é derivado de várias aplicações industriais, ele também é uma fonte de carbono bastante comum para muitas espécies microbianas, incluindo microalgas, sendo que desde a década de 70 podem ser encontrados na literatura dados de cultivo de microalgas utilizando acetato como fonte de carbono (Droop, 1974; Bollman e Robinson, 1977).

### **2.4.3. Inibição por substrato**

Altas concentrações de substrato podem inibir o crescimento da microalga, na verdade, inibição pelo substrato é um dos principais problemas que impedem elevadas densidades celulares de microalgas em culturas heterotróficas (Chen e Johns, 1995). Esta é uma das razões que justifica o uso de sistemas de batelada alimentada, a proposta desta configuração é manter constantemente baixa a concentração de substrato, evitando os efeitos adversos de inibição sobre o crescimento e rendimento do cultivo (Schmidt *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2008).

Esta proposta cria um dilema: quão baixo? Ou seja, qual é a concentração exata de substrato que vai levar a maior taxa de crescimento e produtividade? Isso vai depender muito da espécie da microalga e das condições específicas de crescimento. Por exemplo, a *Chlorella vulgaris* tem sido cultivada em concentrações de glicose entre 5 e 20 g.L<sup>-1</sup> (Heredia-Arroyo *et al.*, 2011). Já a *Chlorella protothecoides* já foi cultivada em concentrações em torno de 85g/L (Shi *et al.*, 1999). Schmidt e colaboradores (2005) cultivaram a *Galdieria sulphuraria* com concentrações de glicose de até 500 g.L<sup>-1</sup>, porém, a microalga tolerou bem até 166 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Já a *Nitzschia laevis*, cultivada por Wen e Chen (2000) teve seu rendimento diminuído com o aumento da concentração de glicose de 1 a 40 g.L<sup>-1</sup>.

Em suma, a concentração de substrato ideal necessária para proporcionar maiores crescimento e produtividade ainda não é conclusiva na literatura. Estas informações devem ser investigadas para cada espécie de microalga, pois esta resposta pode estar relacionada com a cepa, como fator primário, e com as condições

ambientais, como fator secundário (Perez-Garcia *et al.*, 2010). Consequentemente, cada combinação de fatores pode levar a níveis de consumo de substrato e crescimento celular diferentes.

#### **2.4.4. Razão carbono/nitrogênio (C/N)**

Além do carbono, o nitrogênio é um nutriente essencial para o crescimento de algas, é quantitativamente um elemento muito importante da célula da microalga (Becker, 1994), representando de 7 a 10% do seu peso seco (Richmond, 2004).

A relação carbono-nitrogênio (C/N) também tem um impacto significativo sobre o crescimento de microalgas e biossíntese de lipídios (Chen e Chen, 2006). Normalmente, a razão C/N mássica requerida para o desenvolvimento das microalgas é 20/1 ou 30/1 (Fontenot *et al.*, 2006).

#### **2.4.5. Contaminação**

Problemas de contaminação por fungos, leveduras, bactérias e por outras espécies de microalgas são comuns em cultivos de microalgas. Certos tipos de contaminação são inevitáveis em cultivos abertos de microalgas, tendo em vista a falta de condições assépticas, onde nem o meio de cultivo e nem o ambiente são estéreis (Becker, 1994).

Até mesmo a produtividade pode ser afetada pela contaminação com outras microalgas e outros microrganismos não desejados. Portanto, é necessário controlar e monitorar tais contaminantes para se obter uma biomassa de microalgas livre de impurezas prejudiciais, ou para certos produtos, manter os contaminantes dentro de limites aceitáveis. O crescimento deve ser acompanhado por observações microscópicas (Richmond, 2004).

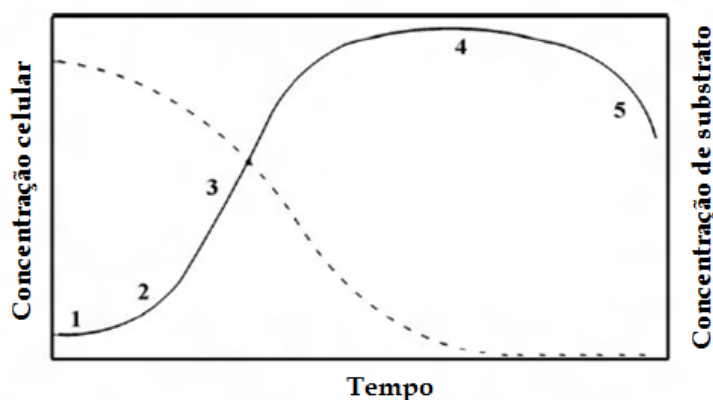
#### **2.5. Cinética de processos fermentativos**

O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar as taxas de crescimento celular, de consumo de substrato, formação de produto e demais parâmetros relacionados, além de verificar a influência de outros fatores como pH, temperatura e inibidores sobre estas taxas (Bailey e Ollis, 1986).

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação (Schmidell *et al.*, 2001).

Entende-se como componentes, o microrganismo (ou biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os substratos que compõe o meio de cultura, representados por  $X$ ,  $P$  e  $S$  respectivamente. Tais valores experimentais de concentração, quando representados em função do tempo, permitem o traçado das curvas de ajuste, ou também chamadas curvas de crescimento celular. (Schmidell *et al.*, 2001).

A Figura 2.4 apresenta as curvas típicas de crescimento celular de microalgas (linha sólida), para uma cultura em batelada e concentração de nutrientes (linha tracejada) no decorrer do cultivo (Mata *et al.*, 2010). Cinco fases de crescimento podem ser reconhecidas: (1) fase *lag*, (2) fase de aceleração do crescimento, (3) fase exponencial, (4) fase estacionária e (5) fase de morte (Mata *et al.*, 2010; Schmidell *et al.*, 2001):



**Figura 2.4.** Representação esquemática do crescimento de microalgas cultivadas em batelada. Sendo: concentração celular (linha sólida) e concentração de substrato (linha tracejada) (adaptada de Mata *et al.*, 2010).

A fase *lag* ou de adaptação é definida como o período em que o número de organismos permanece praticamente inalterado, é a fase de adaptação metabólica ao novo ambiente. Na fase *lag* o metabolismo celular está direcionado para sintetizar as

enzimas requeridas para o crescimento nas novas condições ambientais encontradas pelas células.

Na fase de aceleração a taxa de crescimento específico é continuamente aumentada. Na fase exponencial de crescimento, a máxima taxa de crescimento específica é alcançada e é caracterizada por um aumento significativo da massa celular. Após um determinado período de crescimento exponencial, as condições ambientais tornam-se desfavoráveis pela escassez de nutrientes essenciais e possível acúmulo de metabólitos tóxicos.

Depois da fase exponencial tem-se a fase de crescimento estacionário, na qual a máxima concentração celular é alcançada e a taxa de crescimento específica é continuamente reduzida e a fase de morte ou declínio é aquela em que a maioria das células está em processo de morte.

A cinética possibilita também uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo, (como exemplo a natureza e concentração de nutrientes, temperatura, presença de inibidores, qualidade de mistura etc...), por intermédio de variáveis, como: as velocidades de transformação e os fatores de conversão, obtidas a partir das curvas de crescimento (Schmidell *et al.*, 2001).

## **2.6. Modelagem matemática de processos biotecnológicos**

Borzani *et al.*, (2001) definem a modelagem matemática de processos biotecnológicos como a tentativa de representar, através das equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente do biorreator, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e as velocidades com que essas transformações se processam.

Para Liu e colaboradores (2003), um modelo pode ser definido como uma ferramenta que descreve as relações entre as principais variáveis de estado e explica qualitativamente o comportamento do sistema, sendo capaz de fornecer sugestões para a análise, desenvolvimento e operação de um biorreator.

O objetivo da modelagem matemática de um processo fermentativo é, portanto, organizar informações desconexas sobre os eventos em um conjunto coerente, identificar quais sistemas e interações são relevantes em um sistema, descobrir novas estratégias que permitam descrever o comportamento do processo em determinadas condições e entender as características qualitativamente importantes para o processo (Bailey e Ollis, 1986).

Segundo Borzani *et al.* (2001) os modelos cinéticos de processos fermentativos podem ser classificados quanto ao número de componentes usados na representação celular em dois tipos:

- ✓ Modelos não estruturados: o microrganismo é visto como uma espécie reagente simples, possivelmente com uma composição química fixa, sem considerar variações nos componentes unicelulares;
- ✓ Modelos estruturados: as células são descritas com maiores detalhes, considerando, por exemplo, componentes intracelulares, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente.

Ainda segundo Borzani *et al.* (2001), quanto à heterogeneidade da população microbiana, os modelos cinéticos podem ser classificados em:

- ✓ Modelos não segregados: a população é considerada homogênea, isto é, todas as células apresentam o mesmo comportamento;
- ✓ Modelos segregados: as células são consideradas discretas, como indivíduos de uma população heterogênea, como distribuição de idade, de tamanho e de propriedades celulares.

Segundo Andrietta (1994), os tipos de modelo mais encontrados na literatura para descrever processos fermentativos são não estruturados e não segregados. Muitas tentativas têm sido realizadas no sentido de procurar interpretar resultados experimentais com o auxílio de modelos matemáticos visando, por um lado, colaborar na elucidação de mecanismos envolvidos no processo e, por outro lado, estabelecer um



conjunto de equações que possibilitem o adequado controle do sistema e sua otimização.

Modelos matemáticos e cinéticos de crescimento celular são utilizados para prever os principais parâmetros cinéticos, tais como a máxima velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{máx}$ ), máxima concentração celular ( $X_{máx}$ ) e duração da fase *lag* ( $\lambda$ ). Alguns dos principais modelos para representação do crescimento celular estão apresentados na Tabela 2.3.

Os modelos Logístico e Gompertz modificado foram utilizados no presente trabalho devido a menor complexidade numérica associada ao cálculo e a boa capacidade de descrição dos mesmos em relação aos dados experimentais.

**Tabela 2.3.** Modelos de Crescimento Celular.

Modelo Cinético		Eq.
Logístico	$y = \frac{A + C}{1 + \exp^{(-B(t-M))}}$	2.1
Gompertz	$y = A + C \exp^{(-\exp[-B(t-M)])}$	2.2
Gompertz Modificado	$y = C \cdot \exp^{-\exp\left[\frac{\mu_{max} \exp(I)}{C}(\lambda - t) + I\right]}$	2.3
Baranyi	$y = \mu_{max} A(t) - \ln\left(1 + \frac{\exp^{\mu_{max} A(t)} - 1}{\exp^c}\right)$	2.4
	$A(t) = t + \frac{I}{\mu_{max}} \ln\left(\exp^{-\mu_{max} t} + \exp^{-\mu_{max} \lambda} - \exp^{-\mu_{max}(t+\lambda)}\right)$	
Morgan	$y = \frac{A \cdot t^v}{k^v + t^v}$	2.5

Fonte: Logístico (Pearl e Reed, 1920); Gompertz (Gompertz, 1985); Gompertz Modificado (Zwietering *et al.*, 1990); Baranyi (Baranyi e Roberts, 1993); Morgan (Morgan *et al.*, 1975).

O modelo logístico descreve o crescimento celular de populações de microrganismos em função da concentração inicial e final, tempo e taxa de crescimento (Pearl e Reed, 1920). O modelo clássico de Gompertz (Equação 2.2) não considera a fase *lag*, como é o caso de sua forma modificada, mas apenas o aumento da densidade de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial (McMeekin *et al.*, 1993). Zwietering *et al.*, (1990) incluíram três parâmetros ao modelo Gompertz: tempo de fase *lag* ( $\lambda$ ), taxa máxima de crescimento específico ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e máxima concentração celular ( $X_{m\acute{a}x}$ ), resultando no modelo Gompertz modificado (Equação 2.3).

Embora a relação entre o crescimento do microrganismo e o consumo de substrato seja um conjunto de reações complexas, é possível representar este crescimento por modelos relativamente simples. A equação mais simples que representa este fenômeno é a equação proposta por Monod (Equação 2.6) (Monod, 1949), que é similar à de Michaelis-Menten para cinética enzimática (Bailey e Ollis, 1986).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad 2.6$$

Onde  $\mu_{m\acute{a}x}$  é a velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo,  $K_s$  é a constante de Monod (parâmetro de afinidade do microrganismo com o substrato) e  $S$  é a concentração de substrato.

Esta equação demonstra que a velocidade específica de crescimento  $\mu$  é uma função da concentração de substrato limitante, onde elevadas concentrações de substrato promovem a máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ). Porém, é válida somente para sistemas que não possuam efeitos inibidores significativos.

Outros modelos que também levam em consideração apenas a limitação por substrato, foram propostos, e alguns estão apresentadas na Tabela 2.4 (Contois, (1959); Moser, 1958).

**Tabela 2.4.** Modelos de Consumo de Substrato

Nome	Equação	Nº
Teissier	$Y = \mu_{max\_Real} \left( 1 - \exp^{-S.K_s} \right)$	2.7
Moser	$Y = \mu_{max\_Real} \frac{S^n}{K_s + S^n}$	2.8
Contois	$Y = \mu_{max\_Real} \frac{S}{K_s.X + S}$	2.9

A ausência de inibição no processo fermentativo é pouco comum na prática. O problema poderia ser atenuado se fosse, por exemplo, utilizado um valor inicial relativamente baixo de concentração de substrato, porém, é uma alternativa nada interessante do ponto vista comercial, pois, concentrações de substrato muito abaixo do necessário levam a baixa produção do produto de interesse, acarretando em custos elevados para o processo.

Quando o substrato também atua como inibidor do crescimento celular, o modelo de Monod e os outros que não levam em conta este efeito tornam-se insatisfatórios para predizer o comportamento do microorganismo (Okpokwasili e Nweke, 2005). Existem vários modelos na literatura que representam o crescimento celular influenciado por um substrato inibidor, alguns deles estão apresentados na Tabela 2.5.

Os modelos Andrews e Haldane foram utilizados no presente trabalho devido a menor complexidade numérica associada ao cálculo e a boa capacidade de descrição dos mesmos em relação aos dados experimentais.

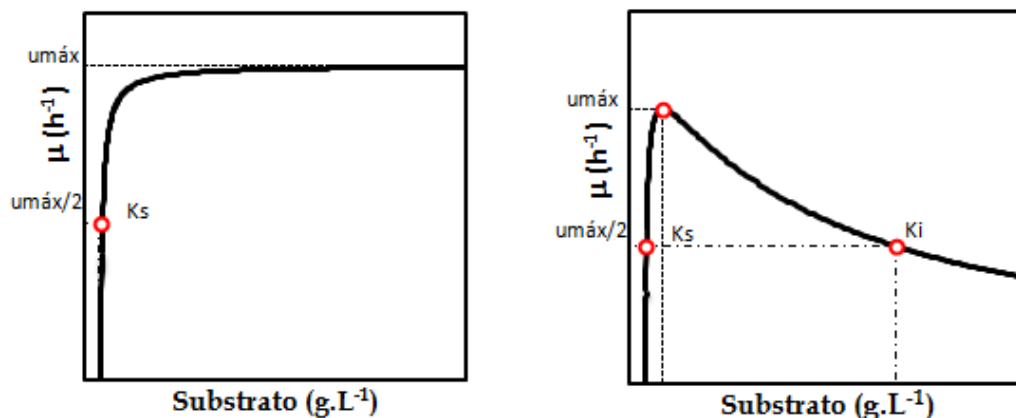
A Figura 2.5 apresenta uma comparação entre as curvas teóricas que podem ser obtidas a partir de modelos que consideram apenas a limitação por um substrato (esquerda) e os modelos que consideram a limitação e inibição por um substrato

(direita), evidenciando o efeito da inibição na máxima velocidade específica de crescimento celular como função da concentração de substrato no sistema.

**Tabela 2. 5.** Modelos de Consumo de Substrato (substrato inibidor).

Nome	Equação	Nº
Webb	$Y = \mu_{\max\_Est} \frac{S \left( 1 + \frac{S}{K} \right)}{S + K_s + \frac{S^2}{K_I}}$	2.10
Aiba	$Y = \mu_{\max\_Est} \frac{S}{K_s + S} \exp \left( - \frac{S}{K_I} \right)$	2.11
Andrews	$Y = \mu_{\max\_Est} \frac{I}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I}}$	2.12
Haldane	$Y = \mu_{\max\_Est} \frac{I}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S + K_s}{K_I}}$	2.13
Yano & Koga	$Y = \mu_{\max\_Est} \frac{S}{K_s + S \left( 1 + \frac{S}{K_I} + \frac{S^2}{K.K_I} \right)}$	2.14
Teissier-Type	$Y = \mu_{\max\_Est} \left[ \exp \left( - \frac{S}{K_I} \right) - \exp \left( - \frac{S}{K_s} \right) \right]$	2.15

(Andrews, 1968; Yano e Koga, 1969; Teissier, 1936; Webb, 1964)



**Figura 2. 5.** Curvas típicas dos modelos de consumo considerando limitação (figura da esquerda) e inibição (figura da direita) pelo substrato.

## 2.7. Referências Bibliográficas

Amaro, H. M., Guedes, A. C., Malcata, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, v.88, p.3402-3410, 2011.

Andrews, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substance. *Biotechnology and Bioengineering*, v.10, p.707-723, 1968.

Andrietta, S. R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica em escala industrial. Campinas, SP, 178p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994.

Bailey, J. E., Ollis, D. F. *Biochemical engineering fundamentals*. New York, N.Y, McGraw-Hill Inc., 1986.

Baranyi, J., Roberts, T. A., McClure, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, v.10, p.43-59, 1993.

Becker, E. W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge studies in biotechnology v. 10. Cambridge university press, Cambridge, 1994.

Bollman, R. C., Robinson, G. G. C. The kinetics of organic acid uptake by three Chlorophyta in axenic culture. *J. Phycol*, v.13, p.1-5, 1977.

Borzani, W., Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone, E. Biotecnologia Industrial. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo, Edgard Blücher Ltda., v.1, 2001.

Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. Appl Microbiol Biotechnol, v.91, p.31-46, 2011.

Chen, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. Trends Biotechnology, v.14, p.421-6, 1996.

Chen, F., Johns, M. R. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. Journal of Applied Phycology, v.7, p.43-46, 1995.

Chen, F., Johns, M. R. Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. Process Biochemistry, v.29, p.245-252, 1994.

Chen, G., Chen, F. Growing phototrophic cells without light. Biotechnology Letters, v.28, p.607-616, 2006.

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae beats ethanol. Trends Biotechnol, v.26, p. 126-131, 2008.

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv, v.25, p.294-306, 2007.

Contois D. E. Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous culture. J Gen Microbiol., v.21, p.40-50, 1959.

de-Bashan, L. E., Trejo, A., Huss, V. A. R., Hernandez, J.-P., Bashan, Y. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. Bioresour Technology, v.99, p.4980-4989, 2008.

Droop, M. R. Heterotrophy of carbon. In: Stewart, W. D. P. (Ed.), Algal Physiology and Biochemistry. Blackwell Scientific, Oxford, UK, p.530-559, 1974.

Fontenot, Q., Bonvillain, C., Kilgen, M., Boopathy, R. Effects of temperature, salinity, and carbon:nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology*, 2006.

Gladue, R., Maxey, J. Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, v.6, n.2, p.131-141, 1994.

Gompertz, B. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philos. Trans. R. Soc. London*, v.115, p.513-585, 1985.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Roger, R., Bo, H. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, v.35, p.2245-2253, 2011.

Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS*, v. 103, n.30, p. 11206-11210, 2006.

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, v.87, p.38-46, 2010.

Lee, Y. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, v.13, p.307-315, 2001.

Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., Dubois-Calero, N. Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog.*, v.24, p.815-820, 2008.

Liang, Y. N., Sarkany, N., Cui, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*, v.31, p.1043-1049, 2009.

Liu, J. Z., Weng, L. P., Zhang, Q. L., Xu, H., Ji, L. N. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v.14, p. 137-141, 2003.

Lourenço, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RIMA, 2006, 588 p.

Malcata, F. X. Microalgae and biofuels: A promising partnership? Trends in Biotechnology, v.29, n.11, p.542-549, 2011.

Mata, T. M., Antonio, A. M., Nídia S. C. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renew Sustainable Energy, v.14, p.217-232, 2010.

Mcmeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T., Ratkowsky, D. A. Predictive microbiology: Theory and application. Wiley, New York, 1993.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy, v.34, p.1-5, 2009.

Monod, J. The growth of bacterial cultures. Ann. Rev. Microbiol., v.3, p.371-394, 1949.

Morgan, P. H., Mercer, L. P., Flodin, N. W. General model for nutritional responses of higher organisms. Proc. Nat. Acad. Sci., v.72, p.4327-4331, 1975.

Moser, H. The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. The Carnegie institute, Washington, DC, 1985.

Muñoz, R., Guieysse, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. Water Res, v.40, p.2799-2815, 2006.

Okpokwasili, G. C., Nweke, C. O. Microbial growth and substrate utilization kinetics. African Journal of Biotechnology, v.5, p.305-317, 2005.

Pearl, R., Reed, L. J. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. Proc. Nat. Acad. Sci., v.6, p.275-288, 1920.

Perez-Garcia, O., Bashan, Y., Puente, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic Growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Phycology, v.47, n.1, p.190-199, 2011.



Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Basahn, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, v.45, p.11-36, 2010.

Pousa, G., Santos, A., Suarez, P. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, v.35, p.5393-5398, 2007.

Richmond, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Sciences Ltd, 2004.

Schmidt, R. A., Wiebe, M. G., Eriksen, N. T. Heterotrophic high-cell density fed-batch cultures of the phycocyanin producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnol Bioeng*, v.90, p.77-84, 2005.

Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotechnologia Industrial*, v.2, Edgard Blücher Ltda., p. 123-178, 2001.

Shi, X. M., Liu, H. J., Zhang, X. W., Chen, F. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. *Process Biochem.*, v.34, p.341- 347, 1999.

Shi, X. M., Zhang, X. W., Chen, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, p.312-318, 2000.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, v.101, p.87-96. 2006.

Suali, E. Sabartly, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.4316-4342, 2012.

Teissier, G. Le lois quantitatives de la croissance. *Ann. Physiol-Chim. Biol.*, v.12, p.527-73, 1936.

Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C. Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, n. 79, p. 707-718, 2008.

Webb, F. C. *Biochemical Engineering*, Van Nostrand, 1964.

Wen, Z. Y., Chen, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v.25, p.218-224, 2000.

Xiong, W., Li, X. F., Xiang, J. Y., Wu, Q. Y. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbial-diesel production. Appl. Microbiol Biotechnol, v.78, p.29-36, 2008.

Xu, H., Miao, X. L., Wu, Q. Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal Biotechnol., v.126, p.499-507, 2006.

Yano, T., Koga, S. Dynamic behaviour of the chemostat subject to substrate inhibition. Biotechnol. Bioeng., v.11, n.2, p.139-153, 1969.

Yeh, K. L., Chen, C. Y, Chang, J. S. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. Journal Biochem. Engineering, 2012. doi:10.1016/j.bej.2012.02.006.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van'tRiet, K., Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol., v.56, p.1875-1881, 1990.

### 3. ESTUDOS DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO PARA CULTIVO HETEROTRÓFICO AXÊNICO DE *Chlorella vulgaris* UTILIZANDO GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO

#### 3.1. Resumo

---

A influência da concentração inicial de glicose na produção de biomassa por *C. vulgaris* foi investigada em cultivos heterotróficos axênicos. Cinéticas de crescimento do microrganismo foram determinadas em meios de cultivo com concentrações iniciais de glicose variando entre 2 e 100 g.L<sup>-1</sup>, mantendo uma relação C/N constante de 20. A glicose foi consumida pelo microrganismo estudado nas condições de heterotrofia, porém promoveu inibição do crescimento celular em concentrações iniciais de glicose a partir de 100 g.L<sup>-1</sup>. A concentração inicial do substrato influenciou significativamente o rendimento celular e os parâmetros cinéticos do cultivo. O maior valor de produtividade celular (1,36 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foi observado no cultivo com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose. O maior fator de conversão de substrato em células (0,62 g/g) foi alcançado com a concentração inicial de 5 g.L<sup>-1</sup> de glicose. A maior produção de biomassa ocorreu com a concentração inicial de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup>, alcançando 10 g.L<sup>-1</sup> de biomassa final. Os resultados evidenciaram ainda que os procedimentos adotados no controle da contaminação foram efetivos para a manutenção da axenia dos cultivos. Foi avaliado o desempenho de diferentes modelos aplicados ao crescimento celular e consumo de substrato da *C. vulgaris*. Foram testados o modelo Logístico e o Gompertz Modificado para a representação do crescimento da biomassa e o modelo de Andrews e o de Haldane para a representação do consumo de substrato. Foi verificado que todos os modelos avaliados apresentaram boa capacidade de descrição dos dados experimentais para todas as concentrações de glicose avaliadas. Os resultados obtidos pelos modelos indicam que a concentração ótima de glicose para o cultivo heterotrófico da *C. vulgaris* é 5,8 g.L<sup>-1</sup>.

---

**Palavras chave:** *Chlorella vulgaris*, cultivo heterotrófico, glicose, inibição por substrato.

### 3.2. Material e métodos

#### 3.2.1. Meio de cultivo

O meio de cultivo sintético BBM modificado (Stein, 1973) (Tabela 3.1) foi utilizado em todos os ensaios, inclusive no preparo do inóculo e manutenção e propagação do microrganismo utilizado.

**Tabela 3.1.** Composição do meio sintético BBM modificado - pH 6.8.

Componente	(mg.L <sup>-1</sup> )	Componente	(mg.L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> EDTA	50	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,98
KOH	3,1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (μL/L)	1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	25	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,82
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57
NaCl	25	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,49
MoO <sub>3</sub>	0,71	NaNO <sub>3</sub> <sup>a</sup>	-

<sup>a</sup>A concentração de nitrato de sódio varia com a concentração de glicose no meio, de acordo com a relação C/N=20.

O pH dos meios de cultivo foram ajustados inicialmente a 6.8 com HCl 1 M. Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

#### 3.2.2. Microrganismo

A cultura estoque de *Chlorella vulgaris* (CPCC90 - Canadian Phycological Culture Centre) foi mantida e propagada em ágar inclinado. O ágar inclinado consistiu de meio líquido adicionado de ágar-ágar (15 g.L<sup>-1</sup>) e glicose (2,0 g.L<sup>-1</sup>).

#### 3.2.3. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com a Figura 3.1. Cada Erlenmeyer de 250 ml contendo meio sólido (ágar inclinado) com células de *C. vulgaris* crescidas na

superfície foi lavado com 3,0 mL de meio líquido. Após homogeneização, 3,0 mL da suspensão foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio líquido adicionado de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 0,6 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio (razão C/N=20).



**Figura 3.1.** Preparo do inóculo.

Os frascos Erlenmeyers foram incubados em shaker (incubadora com agitação shaker e refrigeração - modelo 430 - RD - Nova Ética), a temperatura específica de crescimento de 26 °C, na ausência de luminosidade, sob agitação constante de 140 rpm.

A concentração celular foi monitorada diariamente por medida da densidade óptica a 680nm em Espectrofotômetro digital UV-Vis, Genesys-10 UV. O inóculo foi utilizado em sua fase exponencial de crescimento.

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool 70% e UV por 15 minutos.

### 3.2.4. Condições de cultivo

Os ensaios foram realizados nas seguintes concentrações de glicose: 2; 5; 8; 10; 20; 40 e 100 g.L<sup>-1</sup>, mantendo a relação C/N constante em 20.

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers âmbar e aletados de 250mL. O volume de trabalho foi fixado em 50mL (1/5 da capacidade total), considerando 0,3 g.L<sup>-1</sup> de inóculo inicial. Os frascos foram incubados em shaker, na ausência de luminosidade, na temperatura de 26 °C e agitação de 140 rpm.

Os experimentos e as análises foram realizados em duplicata, permitindo calcular o desvio padrão entre quatro valores. As amostras foram retiradas até o início da fase estacionária de crescimento celular.

### 3.2.5. Controle da axenia dos cultivos

A axenia dos cultivos foi verificada por microscopia ótica, em um Microscópio Biológico com vídeo acromático BVM-100 (Marca Bel Photonics, Milano, Itália). E por plaqueamento em placas de petri com meio BBM modificado sólido, adicionado de glicose (5,0 g.L<sup>-1</sup>), pela técnica de espalhamento na superfície.

### 3.2.6. Cálculos dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos calculados a partir dos dados experimentais obtidos foram: densidade celular máxima ( $X_{máx}$ ); velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{máx}$ ); tempo de geração ( $t_g$ ); tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima ( $t_{X_{máx}}$ ); tempo de residência celular para conversão do substrato ( $t_x$ ); máxima produtividade celular ( $P_x$ ); conversão global de substrato ( $X_s$ ) e fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ).

Os parâmetros cinéticos que foram calculados por equação estão apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Parâmetros cinéticos avaliados.

Parâmetro	Equação	Número da equação
Tempo de geração ( $t_g$ )	$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{máx}}$	(3.1)
Máxima produtividade Celular ( $P_{X_{máx}}$ )	$P_{X_{máx}} = \frac{X_{máx} - X_0}{t_{X_{máx}} - t_0}$	(3.2)
Fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ )	$Y_{x/s} = \frac{X_{máx} - X_0}{-S_0 + S_{X_{máx}}}$	(3.3)
Taxa de consumo de substrato ( $r_s$ )	$r_s = \frac{-S_{X_{máx}} + S_0}{t_{X_{máx}} - t_0}$	(3.4)

Sendo: X - biomassa (g.L<sup>-1</sup>); S - substrato (g.L<sup>-1</sup>); t - tempo (d).

A velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) é calculada pelo coeficiente angular da equação da reta  $\ln(X) \times t$ , encontrado entre os pontos experimentais, considerando para isto no mínimo quatro pontos experimentais e consecutivos.

### **3.2.7. Métodos analíticos**

#### **3.2.7.1. Determinação do pH**

Valores de pH ao longo dos cultivos foram determinados usando método potenciométrico (potenciômetro QUIMIS, modelo Q-400A).

#### **3.2.7.2. Determinação da concentração celular**

A concentração celular foi determinada por medida da densidade ótica, com leitura em 680nm em Espectrofotômetro digital UV-Vis, Genesys-10 UV.

Para a construção da curva padrão, a massa foi determinada por gravimetria, utilizando um kit Kitassato, membrana de 0,22 $\mu\text{m}$  e bomba a vácuo, pela filtração à vácuo de 20mL de meio de cultura, posteriormente seca em estufa à 60°C e submetida à massa constante (APHA, 1998). Este procedimento foi realizado em triplicata.

Depois de conhecida a concentração celular do meio de cultura através da gravimetria, este sofreu várias diluições, e as amostras foram lidas em espectrofotômetro. Com base na relação desses dados foi construída uma curva padrão, permitindo assim que as leituras em espectrofotômetro fossem convertidas em biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

#### **3.2.7.3. Determinação da concentração de glicose**

Em cada amostragem, o meio de cultivo foi filtrado (membrana Milipore 0.22 $\mu\text{m}$ ), sendo a fração líquida armazenada em frascos âmbar, devidamente codificados e mantidos sob refrigeração. Ao final de cada experimento, as amostras armazenadas foram liquefeitas a temperatura ambiente e diluídas em água deionizada para a análise do consumo de glicose pela cromatografia de íons.

Para a cromatografia de íons foi utilizado um equipamento Metrohm (Herisau, Suíça), equipado com um detector amperométrico e duas colunas empacotadas

MetrosepCarb1 conectadas em série (copolímero de poliestireno/divinilbenzeno, com partículas de 5µm, comprimento de 150 mm e 4mm de diâmetro interno). A fase móvel utilizada foi uma solução de NaOH de 100mM. O volume de injeção foi de 20 µL A curva padrão foi construída numa concentração entre 5 a 100 ppm de glicose.

#### 3.2.7.4. Determinação da concentração de nitrogênio total

Em cada amostragem, o meio de cultivo foi filtrado em membrana tipo Millipore com 0,22 µm de diâmetro, sendo determinada a concentração de nitrogênio em um analisador de carbono e nitrogênio TOC-VCSN (Shimatzu, Kyoto, Japão). A amostra injetada no equipamento sofre combustão à 720 °C, sendo decomposta à NO e analisada em detector de quimiluminescência. As concentrações de nitrogênio total foram obtidas por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico × concentração) realizadas previamente com solução padrão de nitrato de potássio (R<sup>2</sup> de 0,998).

#### 3.2.8. Modelos matemáticos

##### 3.2.8.1. Modelos de crescimento celular

Os modelos de crescimento celular selecionados para representar os dados experimentais foram o modelo Logístico (Pearl e Reed, 1920) e o Gompertz Modificado (Zwietering *et al.*, 1990), e correspondem às equações 3.1 e 3.2 respectivamente, apresentadas na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Modelos de Crescimento Celular.

Nome	Modelo Cinético	Eq.
Logístico	$y = \frac{A + C}{1 + \exp^{(-B(t-M))}}$	(3.1)
Gompertz Modificado	$y = C.\exp^{-\exp\left[\frac{\mu_{max}.\exp(1)}{C}(\lambda-t)+1\right]}$	(3.2)

Fonte: Logístico (Pearl e Reed, 1920); Gompertz Modificado (Zwietering *et al.*, 1990).



### 3.2.8.2. Modelos de consumo de substrato

Os modelos de consumo de substrato utilizados correspondem às equações 3.3 e 3.4 apresentadas na Tabela 3.4, sendo eles Andrews e Haldane (Andrews, 1968).

**Tabela 3.4.** Modelos de Consumo de Substrato – 1 Substrato Limitante e Inibidor.

Nome	Equação	Nº
Andrews	$Y = \mu_{max\_Est} \frac{I}{I + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I}}$	(3.3)
Haldane	$Y = \mu_{max\_Est} \frac{I}{I + \frac{K_s}{S} + \frac{S + K_s}{K_I}}$	(3.4)

Fonte: Andrews e Haldane (Andrews, 1968).

### 3.2.8.3. Resolução dos modelos

Para a resolução dos modelos de crescimento celular e consumo de substrato (equações 3.1 a 3.4), foi utilizado o método de Newton presente na extensão *Solver* do software Microsoft Excel® 2007.

O valor da estimativa inicial foi obtido através do gráfico de  $\ln(X) \times t$  para os modelos de crescimento celular. Já para os modelos de consumo de substrato, este valor foi obtido através do gráfico de  $\mu_{m\acute{a}x} \times S$ .

### 3.2.8.4. Avaliação dos modelos

A capacidade representativa dos modelos utilizados foi avaliada através dos parâmetros: coeficiente de determinação ( $R^2$ ), erro médio quadrático ( $RMSE$ ), erro padrão de predição ( $\%SEP$ ), Fator Bias ( $B_f$ ) e Fator de exatidão ( $A_f$ ). Expressões detalhadas para o cálculo desses parâmetros podem ser visualizadas na Tabela 3.5 (equações 3.5 a 3.9).

**Tabela 3.5.** Parâmetros de avaliação dos modelos.

Parâmetro	Equação	Número da equação
Coeficiente de Determinação	$R^2 = \frac{(\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}))^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}$	(3.5)
Erro Médio Quadrático	$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(obs - pred)^2}{n}}$	(3.6)
Erro Padrão de Predição	$\%SEP = \frac{100}{m\acute{e}dia\ obs} \sqrt{\frac{\sum(obs - pred)^2}{n}}$	(3.7)
Fator Bias	$B_f = 10^{\frac{\sum \log(pred/obs)}{n}}$	(3.8)
Fator de Exatidão	$A_f = 10^{\frac{\sum  \log(pred/obs) }{n}}$	(3.9)

Fonte: Ross, 1996.

### 3.3. Resultados e discussão

Para utilizar o inóculo na fase exponencial de crescimento, a concentração de biomassa no cultivo de preparo de inóculo foi acompanhada. A Tabela 3.6 compara experimentos na mesma condição de 10g/L de glicose, porém, com o inóculo não controlado e controlado (utilizado na fase exponencial de crescimento).

Os resultados evidenciaram que a utilização do inoculo na fase exponencial de crescimento é efetivo no aumento da produtividade e da concentração celular final dos cultivos em mais de 50%.

**Tabela 3.6.** Análise comparativa do desempenho dos cultivos com inóculo controlado e não controlado.

Parâmetro	Inóculo não controlado	Inóculo controlado (na fase exponencial)
$P_{x\_m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,67	1,36
$X_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	2,50	5,04

Para a investigação da influência da concentração inicial de glicose na produção de biomassa por *C. vulgaris*, foram realizados cultivos em sete diferentes concentrações de glicose: 2; 5; 8; 10; 20; 40 e 100 g.L<sup>-1</sup>.

O nitrato de sódio foi a única fonte de nitrogênio presente no meio de cultivo, sendo este utilizado no preparo dos meios de cultivo proporcionalmente a concentração de glicose utilizada a fim de manter uma razão C/N de 20. Para cada concentração foram obtidos os perfis de pH (Figura 3.2) e cinéticas de crescimento de biomassa e consumos de glicose e nitrato (Figura 3.3).

Através dos perfis de pH apresentados na Figura 3.2, verifica-se uma alcalinização do meio ao longo de todos os cultivos realizados. Esse comportamento também foi verificado nos experimentos realizados por Komor e Tanner (1974) e por Perez Garcia *et al.* (2010), esses autores evidenciaram que a velocidade de aumento do pH depende da concentração inicial e do tipo de açúcar utilizado.

Quanto maior foi a concentração de glicose utilizada, maior foi o valor de pH atingido, exceto para 100 g.L<sup>-1</sup> de glicose, o que pode ser explicado pela inibição do crescimento que ocorreu nessa concentração.

Observando as curvas de consumo de substrato (Figura 3.3) verificou-se que a concentração inicial deste influenciou significativamente o rendimento celular final. Observou-se também que apenas no experimento de 100 g.L<sup>-1</sup> de glicose inicial o açúcar não foi consumido totalmente, neste caso apenas 6,8% da glicose presente no meio de cultivo foi consumida.

Através dos perfis de consumo de nitrato (Figura 3.3) verificou-se que em nenhum dos ensaios o nitrogênio foi consumido totalmente. A partir desta análise foi possível concluir que este substrato foi adicionado em excesso, favorecendo o crescimento celular (Fontenot *et al.*, 2006).

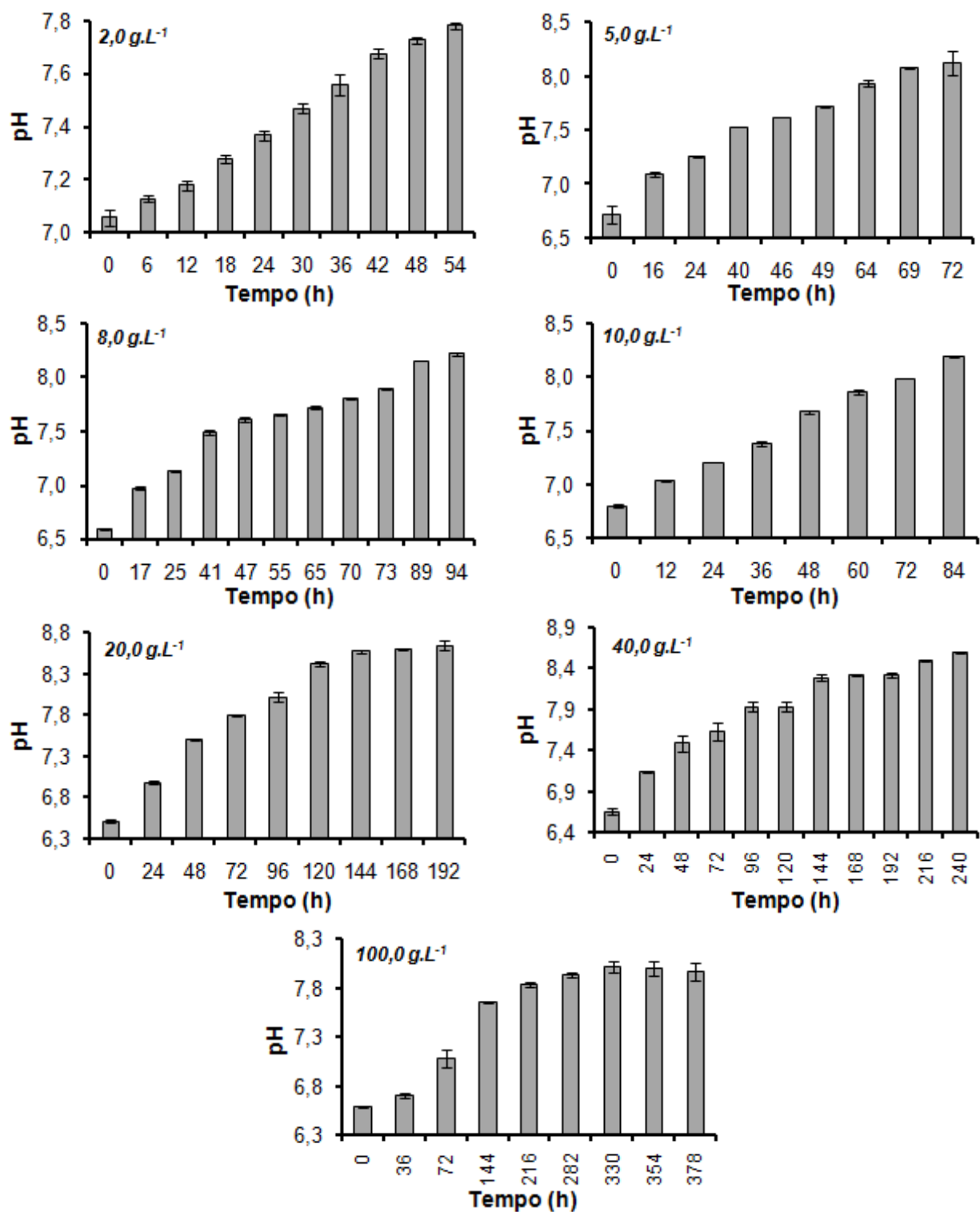
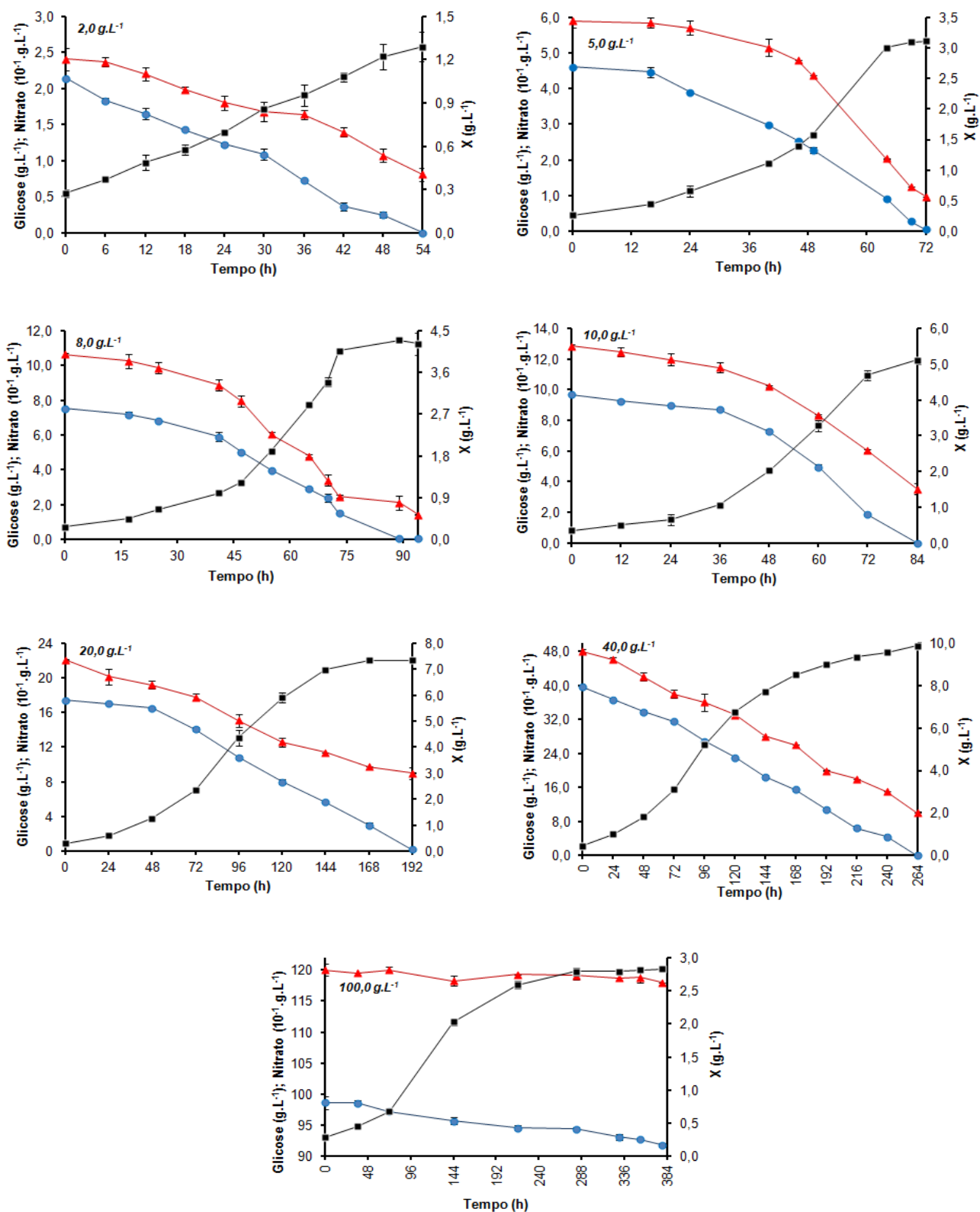


Figura 3.2. Perfil de pH dos ensaios com diferentes concentrações iniciais de glicose.



**Figura 3.3.** Perfis de crescimento celular (■-), consumo de glicose (●-) e consumo de nitrato (-▲-) dos ensaios realizados com diferentes concentrações iniciais de glicose.

Ainda analisando os gráficos da Figura 3.3, as curvas de crescimento celular apresentaram comportamento próximo ao sigmoidal, apesar de nenhum dos cultivos terem apresentado uma fase de latência (lag) acentuada. A fase lag é comum para muitas espécies microbianas, incluindo microalgas, porém, nos ensaios realizados a fase lag em geral teve duração inferior a 24 horas. A inoculação dos experimentos com a cepa na fase exponencial de crescimento pode explicar a falta de fase lag nos cultivos realizados pelo presente trabalho.

Os parâmetros cinéticos de crescimento celular da *C. vulgaris* nas diferentes concentrações de glicose avaliadas são comparados na Tabela 3.7 e Figura 3.4. Observa-se que a concentração de glicose promoveu um efeito significativo sobre todos os parâmetros cinéticos.

Foi observado que a máxima concentração de biomassa (Figura 3.4-a) aumentou de 1,29 g.L<sup>-1</sup> para aproximadamente 10 g.L<sup>-1</sup> quando a concentração inicial de glicose aumentou de 2 para 40 g.L<sup>-1</sup>. Entretanto o aumento da concentração de glicose para 100 g.L<sup>-1</sup> resultou em redução da concentração final de biomassa e menores crescimento específico (Figura 3.4-c) e produtividade (Figura 3.4-e).

A biomassa máxima dos cultivos iniciados com até 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose foi obtida em até 3,5 dias (Figura 3.4-b). Já o cultivo iniciado com 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose teve o maior valor em biomassa alcançado em 8 dias, sendo este tempo ainda maior no cultivo de 40 g.L<sup>-1</sup> (11 dias) e o cultivo de 100 g.L<sup>-1</sup> que precisou de 16 dias para alcançar a densidade celular máxima (Figura 3.4-b).

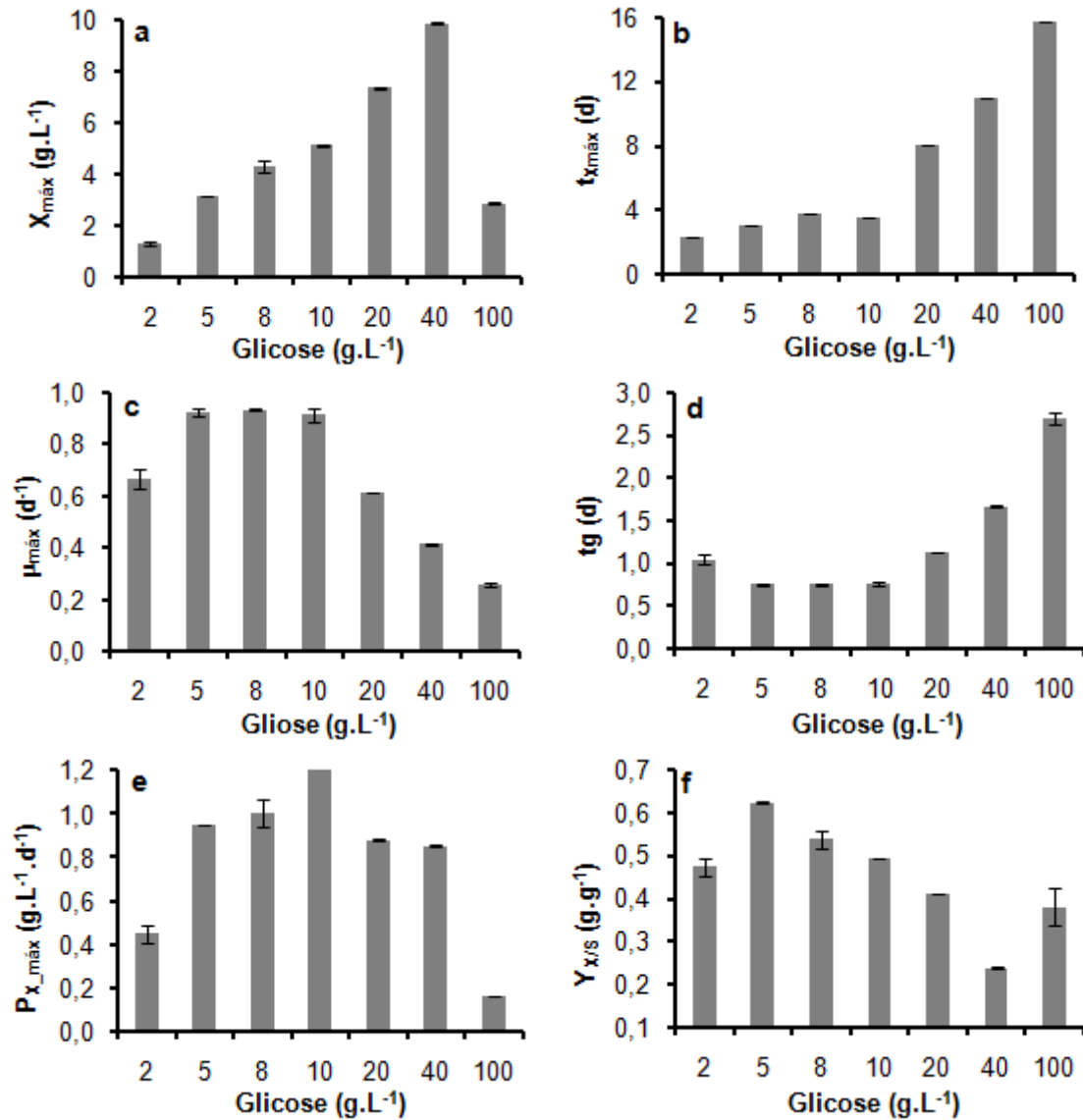
O mesmo comportamento é observado para o tempo de geração que também aumenta de acordo com o aumento da concentração inicial de glicose, a partir de 10,0 g.L<sup>-1</sup> iniciais desta (Figura 3.4-d).

Na Figura 3.4-c pode ser verificado que as maiores velocidades máximas específicas de crescimento celular foram obtidas nas concentrações iniciais de 5, 8 e 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Em concentrações de glicose superiores a 10 g.L<sup>-1</sup> o  $\mu_{m\acute{a}x}$  caiu acentuadamente.

**Tabela 3.7.** Parâmetros cinéticos de crescimento celular dos cultivos realizados com glicose.

Parâmetro	Concentração Glicose (g.L <sup>-1</sup> )						
	2,0	5,0	8,0	10,0	20,0	40,0	100,0
$X_{máx}$ (g.L <sup>-1</sup> )	1,29 ± 0,10	3,11 ± 0,016	4,30 ± 0,01	5,11 ± 0,05	7,34 ± 0,02	9,86 ± 0,01	2,83 ± 0,04
$\mu_{max}$ (d <sup>-1</sup> )	0,667 ± 0,040	0,924 ± 0,02	0,933 ± 0,004	0,914 ± 0,026	0,614 ± 0,003	0,416 ± 0,004	0,257 ± 0,007
$tg$ (d)	1,04 ± 0,06	0,75 ± 0,01	0,74 ± 0,00	0,76 ± 0,02	1,13 ± 0,01	1,66 ± 0,02	2,69 ± 0,07
$t_{Xmax}$ (d)	2,25 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,71 ± 0,00	3,5 ± 0,00	8,00 ± 0,00	11,0 ± 0,00	15,75 ± 0,00
$P_{x\_máx}$ (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,450 ± 0,043	0,951 ± 0,001	1,005 ± 0,060	1,362 ± 0,016	0,880 ± 0,003	0,855 ± 0,001	0,161 ± 0,002
$X_s$ (%)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	6,8 ± 0,7
$Y_{X/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,47 ± 0,02	0,62 ± 0,00	0,54 ± 0,02	0,49 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,38 ± 0,04

Densidade celular máxima ( $X_{max}$ ); velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ); tempo de geração ( $tg$ ); tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima ( $t_{Xmax}$ ); produtividade celular máxima ( $P_{x\_máx}$ ); conversão global de substrato ( $X_s$ ); fator de conversão de substrato em células: ( $Y_{X/s}$ ).



**Figura 3.4.** Comparação em forma gráfica dos principais parâmetros cinéticos. Sendo: **a.**  $X_{m\acute{a}x}$  (densidade celular máxima); **b.**  $t_{x_{m\acute{a}x}}$  (tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima); **c.**  $\mu_{m\acute{a}x}$  (velocidade máxima específica de crescimento); **d.**  $t_g$  (tempo de geração); **e.**  $P_{x_{m\acute{a}x}}$  (produtividade celular máxima) e **f.**  $Y_{x/s}$  (rendimento de substrato em células).

Dentre as três concentrações iniciais de glicose de maior  $\mu_{m\acute{a}x}$  (5, 8 e 10 g.L<sup>-1</sup>), foi verificado maior rendimento de glicose em biomassa para 5 g.L<sup>-1</sup> (Figura 3.4-f) e maior produtividade máxima de biomassa para 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose inicial (Figura 3.4-e).



O cultivo de 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose apresentou densidade celular máxima superior a 10 g.L<sup>-1</sup> (Figura 3.4-a), entretanto, embora essa condição tenha propiciado a maior produção de biomassa, a velocidade específica de crescimento, o rendimento de substrato em células e a produtividade em biomassa foram reduzidas, quando comparadas as concentrações de glicose entre 5 e 10 g.L<sup>-1</sup>, fato que pode ser atribuído a maior inibição do crescimento celular observada nas maiores concentrações de glicose testadas.

Não se observou (Figura 3.4) inibição por glicose em baixas concentrações, no entanto, acima de 40 g.L<sup>-1</sup>, o crescimento começa a ser inibido progressivamente, sendo que 100 g.L<sup>-1</sup> de glicose exerceram maior efeito inibitório sobre o desempenho da *C. vulgaris*. A inibição foi observada com a diminuição da velocidade específica de crescimento, da produtividade e do rendimento de substrato em células.

O efeito de inibição com o aumento da concentração de glicose também foi observado para *Chlorella protothecoides* quando esta foi cultivada com concentrações de glicose entre 1,5 e 6% (Xiong *et al.*, 2008). No entanto, a influência negativa de maiores concentrações de glicose só apareceu durante os três primeiros dias de cultivo. Após este tempo, maiores concentrações de glicose levaram a maiores produtividades em biomassa em nove dias (Xiong *et al.*, 2008). Deste modo, o efeito da inibição é dependente da cepa e precisa ser avaliado individualmente para a cepa em estudo.

Liang e colaboradores (2009), também utilizando glicose como substrato para o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris*, cepa #259, a partir de 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, obtiveram 1,2 g.L<sup>-1</sup> de biomassa máxima final, em 6 dias, obtendo assim uma produtividade de 0,151 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (Tabela 3.8). Em nosso estudo, a partir da mesma quantidade de glicose (10 g.L<sup>-1</sup>) a biomassa alcançada foi 5,11 g.L<sup>-1</sup> em 84 horas, o que se refere a uma produtividade de 1,362 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, valores consideravelmente superiores.

Heredya-Arroyo *et al.* (2011) (Tabela 3.8) cultivou a *C. vulgaris* 2714 com glicose, porém, com 5 g.L<sup>-1</sup> deste substrato e em regime mixotrófico, obtiveram 2,5 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 48 horas, o cultivo com a mesma concentração de substrato realizado no presente trabalho, chegou a 3,11 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 72 horas.

**Tabela 3.8.** Comparação de cultivo heterotrófico com *C. vulgaris* utilizando glicose como fonte de carbono.

Referência	Cepa	Condições de cultivo	$X_{\text{máx}}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$P_{X_{\text{máx}}}$ (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	$\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )	$t_{x_{\text{máx}}}$ (d)
Presente trabalho	<i>Chlorella vulgaris</i> CPCC90	Heterotrofia Shaker 26°C, 140 rpm S=10,0 g.L <sup>-1</sup>	5,11	1,36	0,91	3,5
Liang <i>et al.</i> (2009)	<i>C. vulgaris</i> #259	Heterotrofia Shaker T°C ambiente 150 rpm S=10,0 g.L <sup>-1</sup>	1,2± 0,02	0,151	-	6
Heredia-Arroyo <i>et al.</i> (2011)	<i>C. vulgaris</i> 2714	Mixotrofia Shaker 26°C, 160 rpm pH inicial 6,8 S=5,0 g.L <sup>-1</sup>	2,5	Entre 0,75 e 1,0	-	2
Perez-Garcia <i>et al.</i> (2011)	<i>C. vulgaris</i> 2714	Heterotrofia Shaker 28±1°C 120 rpm pH inicial 6,7 S=20 g.L <sup>-1</sup>	8x10 <sup>6</sup> Celulas/ ml	-	0,426	5
Ogawa e Aiba (1981)	<i>C. vulgaris</i> 211/8K	Heterotrofia Shaker, 30°C pH inicial 6,0 S=10,0 g.L <sup>-1</sup>	-	-	2,52	-
		Mixotrofia Shaker, 30°C pH inicial 6,0 S=10,0 g.L <sup>-1</sup>	-	-	5,04	-
Yeh <i>et al.</i> (2012)	<i>C. vulgaris</i> ESP-31	Fotobiorreator Mixotrofia 25°C, 300 rpm pH inicial 6,5 S=10,0 g.L <sup>-1</sup>	3,49	0,411	-	8

S - substrato (glicose); As composições dos meios de cultivo se encontram no Anexo 8.1.

Trabalhando com esta mesma cepa, *C. vulgaris* 2714, Perez-Garcia *et al.* (2011), em heterotrofia, com aproximadamente 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose , obtiveram uma velocidade

máxima específica de crescimento de  $0,426 \text{ d}^{-1}$  (Tabela 3.8). O presente trabalho obteve uma velocidade máxima específica de crescimento de  $0,614 \text{ d}^{-1}$  no cultivo iniciado com a mesma concentração de substrato ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ), porém, nos cultivos de 5, 8 e  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, a média da velocidade máxima específica de crescimento foi de  $0,924 \text{ d}^{-1}$ .

Em cada ponto de amostragem foi verificada a axenia do cultivo, por observação visual em microscópio (Figura 3.5), e certificada a ausência de contaminação em todos os experimentos realizados.



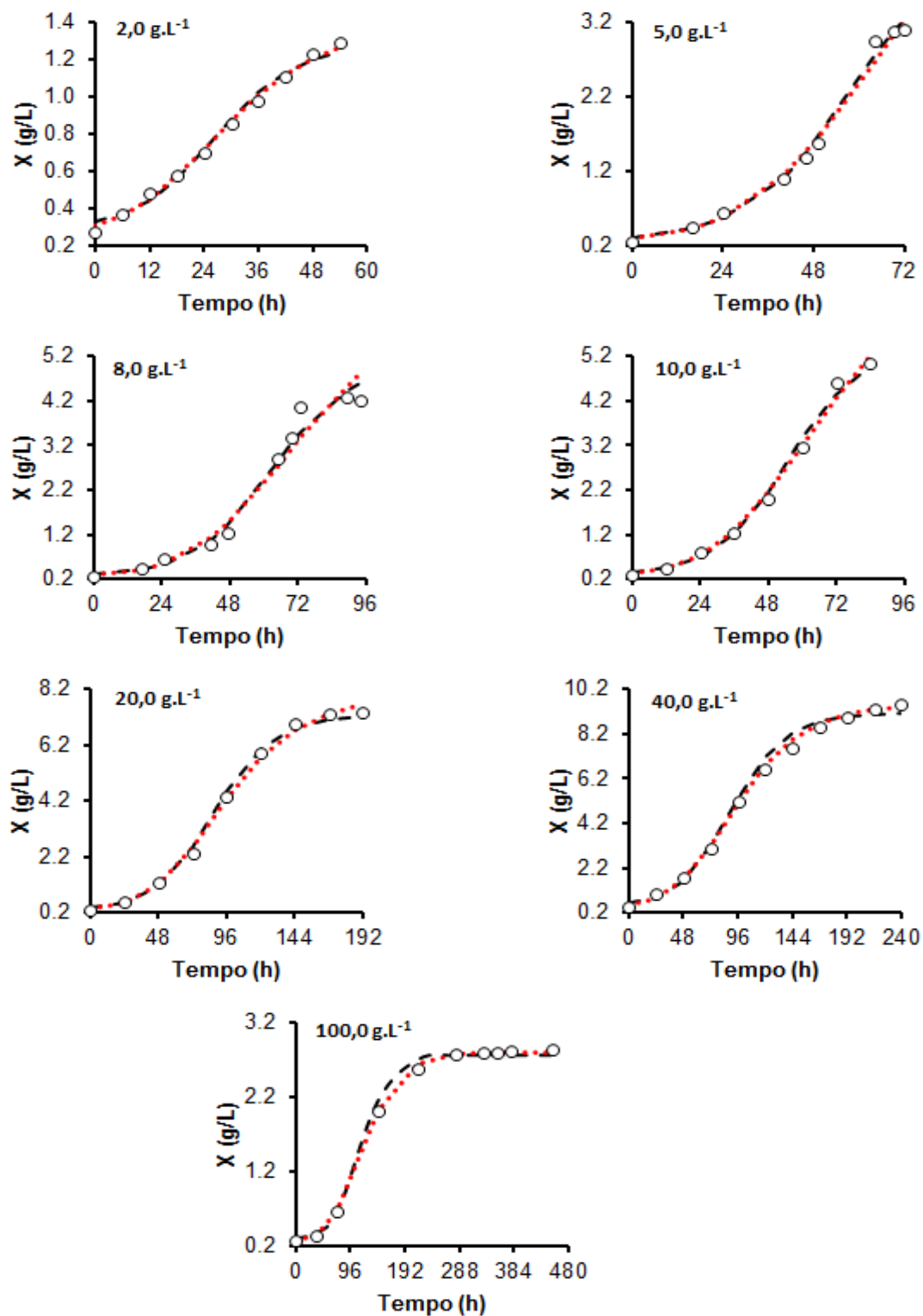
**Figura 3.5.** Verificação da axenia por análise visual em microscópio (*C. vulgaris* CPCC 90 - aumento de 100x).

O problema da competição com outros microrganismos causada pela adição do açúcar em cultivos heterotróficos foi solucionado, uma vez que os resultados evidenciaram que os procedimentos adotados no controle da contaminação foram efetivos para a manutenção da axenia dos cultivos.

### **3.3.1. Modelos matemáticos**

#### **3.3.1.1. Modelos de crescimento celular**

A Figura 3.6 apresenta o ajuste dos modelos Logístico e Gompertz Modificado aos dados experimentais para as diferentes concentrações iniciais de glicose (2; 5; 8; 10; 20; 40 e  $100 \text{ g.L}^{-1}$ ). E a Tabela 3.9 apresenta os resultados dos parâmetros de validação dos modelos aplicados aos dados experimentais mencionados.



**Figura 3.6.** Ajuste dos modelos de crescimento celular aos dados experimentais. Sendo: (---) LO, (...) GM e ( $\circ$ ) dados experimentais.

O erro médio quadrático, RMSE, representa a adequação dos modelos aos dados experimentais, quanto melhor o ajuste do modelo, menor será o valor do RMSE calculado. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) evidencia a variação explicada pela regressão linear devendo assumir valores próximos da unidade. O erro padrão de predição (%SEP) mostra que o modelo será melhor quanto mais esse parâmetro se aproximar do zero. O fator bias ( $B_f$ ) e o fator de exatidão ( $A_f$ ) fornecem uma indicação objetiva do desempenho do modelo. Se o fator bias é menor que 1 significa que os valores preditos são menores que os observados, e se é maior que 1 significa que os valores preditos são maiores que os observados.

De acordo com Ross (1996), modelos que descrevem a taxa de crescimento com  $B_f$  em uma faixa de 0,9–1,05 são considerados bons, de 0,7–0,9 ou 1,06–1,15 são considerados aceitáveis e  $<0,7$  ou  $>1,15$  não podem ser utilizados. Os valores do fator de exatidão representam quanto os preditos diferem dos observados em média, conforme aumenta esse valor, o modelo é menos exato na média, isto é, menor a exatidão da estimativa (Baranyi e Roberts, 1993; Hervás *et al.*, 2001; Ross, 1996).

Foi evidenciado, através do ajuste dos modelos Logístico e Gompertz Modificado aos dados experimentais (Figura 3.6) e dos parâmetros de validação (Tabela 3.9), que os dois modelos avaliados apresentaram aderência satisfatória aos dados experimentais em todas as concentrações de glicose estudadas.

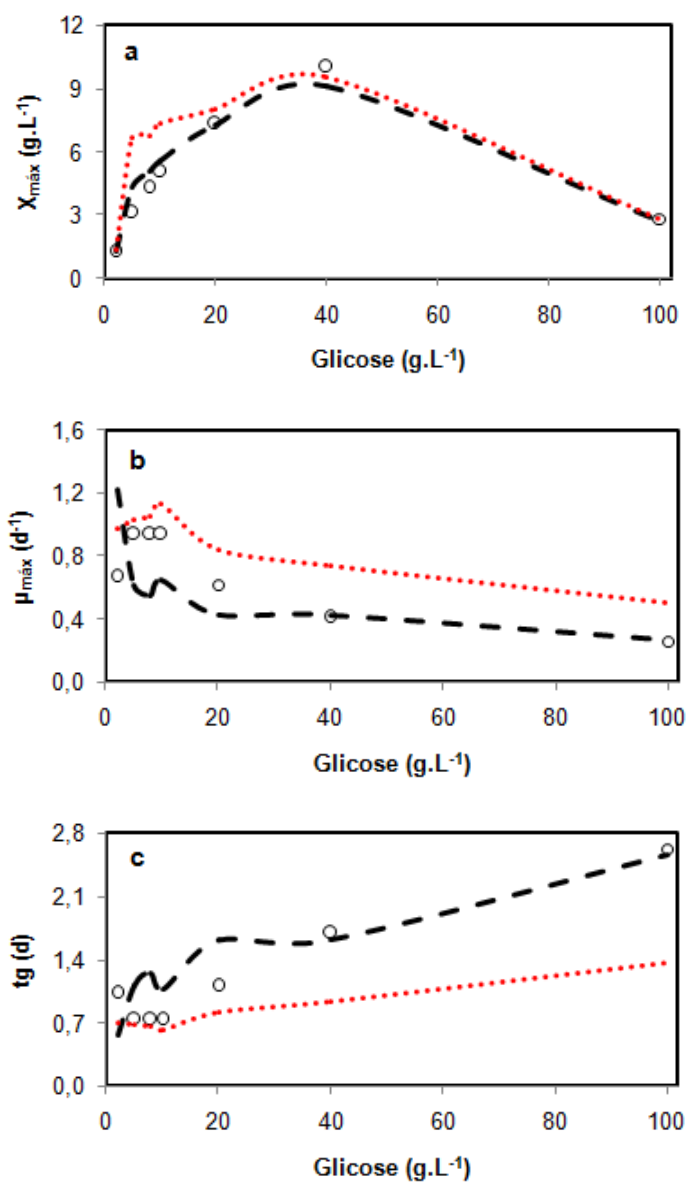
A Figura 3.7 apresenta os parâmetros, máxima concentração de biomassa ( $X_{m\acute{a}x}$ ) (Figura 3.7-a), velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) (Figura 3.7-b), e o tempo de geração (Figura 3.7-c) calculados pelos modelos (Logístico e Gompertz Modificado) e os obtidos experimentalmente para as sete concentrações iniciais de glicose avaliadas. Foi calculado o desvio absoluto entre os valores de  $X_{m\acute{a}x}$ ,  $\mu_{m\acute{a}x}$ , e  $t_g$  experimentais e os calculados pelos modelos (Tabela 3.10).

**Tabela 3.9.** Resultados dos parâmetros de avaliação.

Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Parâmetro	Modelos	
		LO	GM
2,0	Bias	1.008	1.004
	Exatidão	1.048	1.032
	%SEP	0.008	0.006
	RMSE	0.066	0.045
	R <sup>2</sup>	0.984	0.992
5,0	Bias	1.013	1.001
	Exatidão	1.071	1.061
	%SEP	0.006	0.004
	RMSE	0.093	0.072
	R <sup>2</sup>	0.989	0.993
8,0	Bias	1.006	1.002
	Exatidão	1.082	1.099
	%SEP	0.004	0.005
	RMSE	0.095	0.101
	R <sup>2</sup>	0.990	0.989
10,0	Bias	1.013	1.007
	Exatidão	1.082	1.078
	%SEP	0.005	0.004
	RMSE	0.110	0.092
	R <sup>2</sup>	0.988	0.992
20,0	Bias	1.016	1.007
	Exatidão	1.074	1.050
	%SEP	0.003	0.002
	RMSE	0.101	0.061
	R <sup>2</sup>	0.993	0.997
40,0	Bias	1,061	1,001
	Exatidão	1,090	1,051
	%SEP	3,652	2,765
	RMSE	0,220	0,175
	R <sup>2</sup>	0.987	0.998
100,0	Bias	1.010	1.001
	Exatidão	1.042	1.006
	%SEP	0.002	0.000
	RMSE	0.049	0.009
	R <sup>2</sup>	0.998	1.000

Foi possível concluir que os dois modelos foram capazes de descrever bem os dados experimentais (Figura 3.7 e Tabela 3.10), porém, o modelo LO apresentou os menores desvios absolutos médios para o  $X_{\text{máx}}$  e tg. Já para o  $\mu_{\text{máx}}$ , o modelo GM

representou melhor os dados experimentais, embora o desvio entre os dois modelos tenha sido bastante semelhante para este parâmetro.



**Figura 3.7.** Comparação entre os parâmetros  $X_{\text{máx}}$ ,  $\mu_{\text{máx}}$  e  $tg^1$  calculados pelos modelos LO e GM e os obtidos experimentalmente para as sete concentrações de glicose avaliadas. Sendo: (---) LO, (...) GM e (○) dados experimentais.

<sup>1</sup> O parâmetro  $tg$  não é calculado pelo modelo, mas é função do valor de  $\mu_{\text{máx}}$  (calculado pelo modelo).

**Tabela 3.10.** Desvios absolutos entre os valores de  $X_{m\acute{a}x}$ ,  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $tg$  experimentais e calculados pelos modelos LO e GM.

Concentração glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Desvio absoluto*					
	$X_{m\acute{a}x}$		$\mu_{m\acute{a}x}$		$tg$	
	LO	GM	LO	GM	LO	GM
2	0,001	0,128	0,549	0,309	0,461	0,322
5	1,180	3,542	0,321	0,092	0,380	0,068
8	0,767	2,453	0,387	0,116	0,514	0,084
10	0,565	2,317	0,296	0,188	0,337	0,126
20	0,039	0,653	0,192	0,220	0,508	0,285
40	0,887	0,499	0,019	0,324	0,083	0,756
100	0,065	0,019	0,010	0,246	0,067	1,261
<b>Desvio médio</b>	<b>0,501</b>	<b>1,373</b>	<b>0,253</b>	<b>0,214</b>	<b>0,336</b>	<b>0,415</b>

\* Desvio absoluto =  $|X_{calc.} - X_{exp.}|$

O desvio médio geral (considerando os desvios obtidos para o  $X_{m\acute{a}x}$ , o  $\mu_{m\acute{a}x}$  e o  $tg$ ) do modelo LO, foi de 0,363, e o desvio médio geral para o modelo GM foi de 0,667, possibilitando assim concluir que o modelo LO apresentou melhor capacidade descritiva em relação aos dados experimentais.

### 3.3.1.2. Modelos de consumo de substrato

Foram utilizados os modelos de consumo de substrato limitante e inibidor, de Andrews e Haldane (Andrews, 1968) para determinar a concentração ótima de substrato que promove máximas taxas de crescimento e consumo de substrato, em função dos parâmetros cinéticos conhecidos como máxima velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), constante de saturação ( $K_s$ ) e constante de inibição ( $K_I$ ).

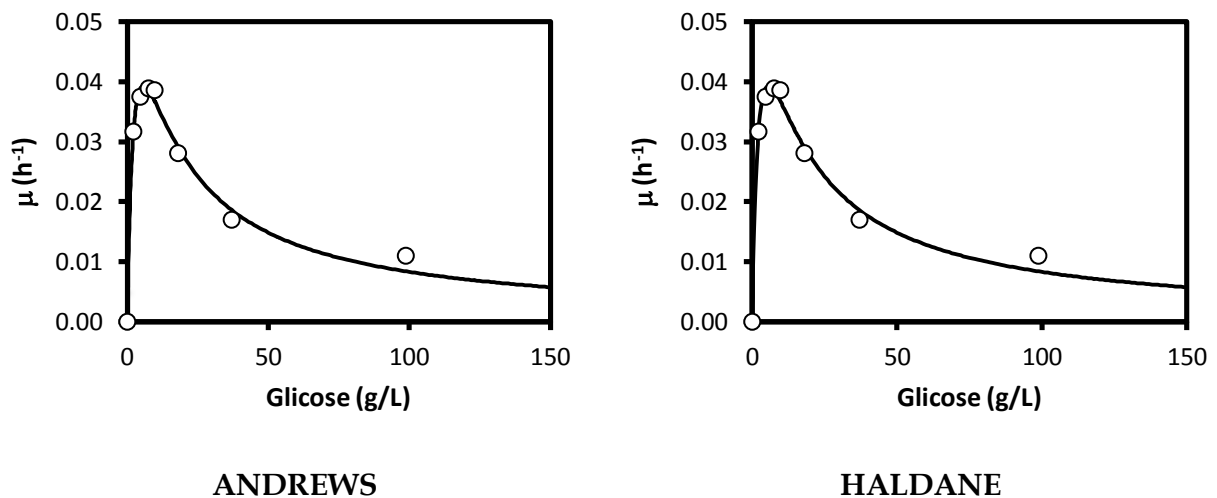
A constante de saturação ( $K_s$ ) é a medida da afinidade do microrganismo ao substrato e corresponde ao menor valor de concentração de glicose que promove  $\mu = \mu_{m\acute{a}x}/2$ , sendo que quanto menor este valor, menor a quantidade necessária de



glicose para promover  $\mu_{\text{máx}}$ . A constante de inibição ( $K_i$ ) é a medida da sensibilidade à inibição e corresponde ao maior valor de concentração de glicose que promove  $\mu = \mu_{\text{máx}}/2$ .

O valor de  $Y$  equivale ao valor máximo de  $\mu$  obtido para cada concentração inicial de glicose testada, podendo ser utilizado o valor obtido pelo coeficiente angular da reta de melhor ajuste para o gráfico  $\ln(x) \times t$  de cada ensaio.

A Figura 3.8 apresenta o ajuste dos dados experimentais aos modelos de consumo de substrato testados e a Tabela 3.11 apresenta os resultados dos parâmetros de validação desses modelos. Para os dois modelos, os resultados dos parâmetros de validação apresentaram variação inferior a  $10^{-3}$  (Tabela 3.11). Pode-se verificar que os modelos Andrews e Haldane apresentam boa capacidade de descrição do consumo de glicose, bem como do comportamento de inibição por substrato para a *Chlorella vulgaris* (Figura 3.8 e da Tabela 3.11).



**Figura 3.8.** Ajuste dos modelos de consumo de substrato limitante e inibidor aos dados experimentais de glicose (— Modelo; ○ Experimental).

**Tabela 3.11.** Resultados dos parâmetros de Validação.

	<b>Andrews</b>	<b>Haldane</b>
Bias	0,975	0,972
Exatidão	1,074	1,075
%SEP	5,143	5,142
RMSE	0,001	0,001
R <sup>2</sup>	0,981	0,982

**Tabela 3.12.** Parâmetros obtidos pelos Modelos Andrews e Haldane.

	<b>Andrews</b>	<b>Haldane</b>
<b>K<sub>s</sub> (g/L)</b>	2,70	4,03
<b>K<sub>I</sub> (g/L)</b>	12,26	8,23
<b>K<sub>s</sub>/K<sub>I</sub></b>	0,22	0,49
<b>μ<sub>máx</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	0,0762	0,1135
<b>tg* (h)</b>	9,09	6,11

\*Este parâmetro não é calculado pelo modelo, mas é função do valor de μ<sub>máx</sub>.

Calculando a derivada da função em relação a concentração de substrato, e igualando o resultado da derivada a zero é possível a obtenção do ponto máximo da função. Assim, para o modelo de Andrews temos:

$$\frac{d}{dS} \left( \frac{\mu_{máx\_Est}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I}} \right) = 0 \quad (3.10)$$

Realizando as operações matemáticas descritas no Apêndice (seção 8.2), temos:

$$\frac{\mu_{m\acute{a}x\_Est} K_I (K_S K_I - S^2)}{(K_S K_I + S(K_I + S))^2} = 0 \quad (3.11)$$

Assim, o valor da concentração 3tima de glicose deve ser calculado pela Equação (3.12).

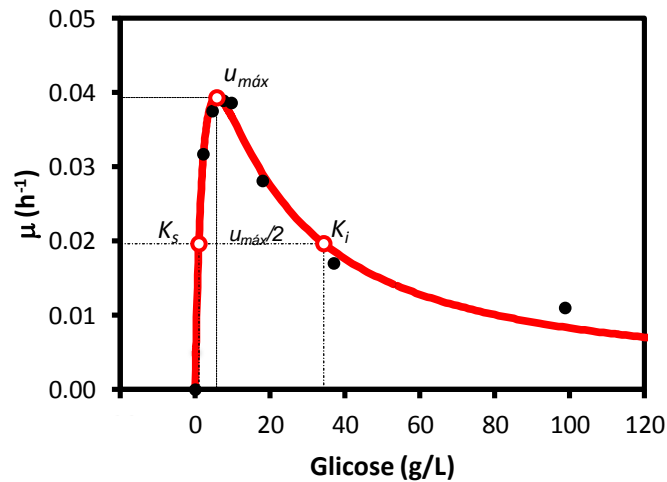
$$S_{3timo} = \sqrt{K_I K_S} \quad (3.12)$$

Aplicando a Equação 3.12  Equação 3.11, temos o valor máximo que pode ser obtido para o parâmetro cinético  $\mu_{m\acute{a}x}$ :

$$\mu_{m\acute{a}x\_Real} = \left( \frac{\mu_{m\acute{a}x\_Est}}{1 + 2\sqrt{\frac{K_S}{K_I}}} \right) \quad (3.13)$$

De forma análoga foram feitos os cálculos para o modelo Haldane e o valor da concentração 3tima de glicose para a máxima eficiência do processo encontrada através da equação 3.12 foi de  $5,8 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ .

A Figura 3.9 mostra o ajuste do modelo Andrews aos dados experimentais de glicose, evidenciando os parâmetros preditos pelo modelo.



**Figura 3.9.** Ajuste do modelo Andrews aos dados experimentais de glicose (— Modelo; • Experimental).

### 3.4. Conclusões

O uso do inóculo na fase exponencial de crescimento foi efetivo no aumento da produtividade e concentração celular final dos cultivos em mais de 50%.

A glicose foi consumida pelo microrganismo estudado nas condições de heterotrofia, e sua concentração inicial no meio influenciou significativamente o rendimento celular e os parâmetros cinéticos do cultivo. A glicose em baixas concentrações não inibiu o crescimento da *C. vulgaris*, no entanto, acima de 20 g.L<sup>-1</sup>, o crescimento começa a ser inibido progressivamente, sendo que 100 g.L<sup>-1</sup> de glicose exerceram maior efeito inibitório sobre o desempenho da *C. vulgaris*. A inibição foi observada com a diminuição da velocidade específica de crescimento e do rendimento de substrato em células.

O maior valor de produtividade celular (1,36 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foi observado no cultivo com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose. O maior fator de conversão de substrato em células (0,62 g/g) foi alcançado com a concentração inicial de 5 g.L<sup>-1</sup> de glicose. A maior produção de biomassa ocorreu com a concentração inicial de glicose de 40 g.L<sup>-1</sup>, alcançando 10 g.L<sup>-1</sup> de biomassa final. Os procedimentos adotados no controle da contaminação foram efetivos para a manutenção da axenia dos cultivos.

Os modelos avaliados apresentaram boa capacidade de descrição dos dados experimentais para todas as concentrações de glicose avaliadas. Os resultados obtidos pelos modelos indicam que a concentração ótima de glicose para o cultivo heterotrófico da *C. vulgaris* é  $5,8 \pm 0,3$  g.L<sup>-1</sup>.

### 3.5. Referencias Bibliográficas

Andrews, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substance. *Biotechnology and Bioengineering*, v.10, p.707-723, 1968.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: American Public Health Association, 1998.

Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, v.10, p.43–59, 1993.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Roger, R., Bo, H. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, v.35, p.2245-2253, 2011.

Hervás S, C., Zurera, G., García, R.M., Martýnez, J. Optimization of computational neural network for its application to the prediction of microbial growth in foods. *Food Science Technoloy*, v.7, p.159–163, 2001.

Komor, E., Tanner, W. The hexose-proton symport system of *Chlorella vulgaris*: specificity, stoichiometry and energetics of sugar-induced proton uptake. *Eur. J. Biochem.*, v.44, p.219-223, 1974.

Liang, Y. N., Sarkany, N., Cui, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett.*, v.31, p.1043-1049, 2009.

Ogawa, T., Aiba, S. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotech. Bioeng.*, v.23, p.1121-1132, 1981.

Pearl, R., Reed, L. J. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.6, p.275–288; 1920.

Perez-Garcia, O., Bashan, Y., Puente, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic Growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*, v.47, n.1, p.190-199, 2011.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Basahn, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, v.45, p.11-36, 2010.

Ross, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.*, v.81, p.501–508, 1996.

Stein, J. R. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. London: Cambridge University Press, 1973.

Xiong, W., Li, X. F., Xiang, J. Y., Wu, Q. Y. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbial-diesel production. Appl. Microbiol Biotechnol., v.78, p.29–36, 2008.

Yeh, K. L., Chen, C. Y., Chang, J. S. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. Journal Biochem. Engineering, 2012. doi:10.1016/j.bej.2012.02.006.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van'tRiet, K., Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol., v.56, p.1875–1881, 1990.

#### 4. ESTUDOS DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO PARA CULTIVO HETEROTRÓFICO AXÊNICO DE *Chlorella vulgaris* UTILIZANDO ACETATO DE SÓDIO COMO FONTE DE CARBONO

##### 4.1. Resumo

---

A influência da concentração inicial de acetato de sódio na produção de biomassa por *C. vulgaris* foi investigada em cultivos heterotróficos axênicos. Cinéticas de crescimento do microrganismo foram determinadas em meios de cultivo com concentrações iniciais de acetato de sódio variando entre 2 e 20 g.L<sup>-1</sup>, mantendo uma relação C/N constante de 20. O acetato de sódio foi consumido pelo microrganismo estudado nas condições de heterotrofia, porém promoveu inibição do crescimento celular em concentrações iniciais a partir de 20 g.L<sup>-1</sup>. A concentração inicial do substrato influenciou significativamente o rendimento celular e os parâmetros cinéticos do cultivo. A máxima velocidade específica de crescimento celular (0,41 d<sup>-1</sup>) foi obtida no experimento contendo 3,5 g.L<sup>-1</sup> iniciais de acetato. Em termos de produção de biomassa, o melhor desempenho do sistema ocorreu com a concentração inicial de acetato de 10 g.L<sup>-1</sup>, alcançando aproximadamente 2,5 g.L<sup>-1</sup> de biomassa final. Os maiores valores de produtividade celular (média de 0,27 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) ocorreram nos cultivos em que foram utilizados inicialmente entre 5 e 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato, e o maior fator de conversão de substrato em células (0,40 g.g<sup>-1</sup>) foi alcançado com concentração inicial de 2 g.L<sup>-1</sup> de acetato. A concentração final de lipídios alcançou 25,11% resultando em uma produtividade de 0,081 g.l<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em massa lipídica, no cultivo com 8 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio. Foi ainda avaliado o desempenho de diferentes modelos aplicados ao crescimento e consumo de substrato da *C. vulgaris*. Os resultados evidenciaram ainda que os procedimentos adotados no controle da contaminação foram efetivos para a manutenção da axenia dos cultivos. Foi verificado que todos os modelos avaliados apresentaram boa capacidade de descrição dos dados experimentais para todas as concentrações de glicose avaliadas. Os resultados obtidos pelos modelos indicam que a concentração ótima de acetato de sódio para o cultivo heterotrófico da *C. vulgaris* é 3,5 g.L<sup>-1</sup>.

---

**Palavras chave:** *Chlorella vulgaris*, cultivos heterotróficos, acetato de sódio e inibição por substrato.

## **4.2. Material e métodos**

### **4.2.1. Meio de cultivo**

O meio de cultivo utilizado em todos os ensaios, inclusive no preparo do inóculo e manutenção e propagação do microrganismo utilizado, foi o mesmo apresentado na Tabela 3.1 (seção 3.2.1). Neste caso, a concentração de nitrato de sódio varia com a concentração de acetato de sódio no meio, de acordo com a relação C/N=20.

O pH dos meios de cultivo foram ajustados inicialmente a 6.8 com HCl 1 M. Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

### **4.2.2. Microrganismo**

A cultura estoque de *Chlorella vulgaris* (CPCC90 - Canadian Phycological Culture Centre) foi mantida e propagada em ágar inclinado. O ágar inclinado consistiu de meio líquido adicionado de ágar-ágar (15 g.L<sup>-1</sup>) e acetato de sódio (2,0 g.L<sup>-1</sup>).

### **4.2.3. Preparo do inóculo**

O preparo do inóculo foi realizado como descrito na seção 3.2.2. O meio de cultivo utilizado no preparo do inóculo consistiu de meio líquido com 2 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio e 0,18 g.L<sup>-1</sup> de nitrato (razão C/N mantida em 20).

A concentração celular foi monitorada diariamente por medida da densidade óptica a 660 nm. O inóculo foi utilizado em sua fase exponencial de crescimento.

### **4.2.4. Condições de cultivo**

Os ensaios foram realizados nas seguintes concentrações de acetato de sódio: 2; 3,5; 5; 8; 10 e 20 g.L<sup>-1</sup>, mantendo a relação C/N constante em 20. As condições de cultivo foram as mesmas descritas na seção 3.2.4.

### **4.2.5. Controle da axenia dos cultivos**

A verificação da axenia dos cultivos foi realizada da mesma forma descrita na seção 3.2.5.



#### 4.2.6. Cálculos dos parâmetros cinéticos

Além dos parâmetros cinéticos descritos na seção 3.2.6., também foram calculados o teor de lipídios, a máxima produtividade de lipídios ( $P_L$ ) e o fator de conversão de substrato em lipídios ( $Y_{L/S}$ ), os dois últimos são calculados pelas equações 4.1 e 4.2 (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1.** Parâmetros cinéticos avaliados.

Parâmetro	Equação	Número da equação
Máxima produtividade de lipídios $P_L$	$P_L = \frac{L - L_0}{t_L - t_0}$	(4.1)
Fator de conversão de substrato em lipídios ( $Y_{L/S}$ )	$Y_{L/S} = \frac{L - L_0}{-S_0 + S_L}$	(4.2)

Sendo: L - Lipídios (g.L<sup>-1</sup>); S - substrato (g.L<sup>-1</sup>); t - tempo (d).

#### 4.2.7. Métodos analíticos

##### 4.2.7.1. Determinação do pH

A dinâmica do pH ao longo dos cultivos foi avaliada usando método potenciométrico (potenciômetro QUIMIS, modelo Q-400A).

##### 4.2.7.2. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada indiretamente por medida da densidade ótica, com leitura em 660nm em Espectrofotômetro digital.

##### 4.2.7.3. Determinação da concentração de acetato de sódio

Em cada amostragem, o meio de cultivo foi filtrado (membrana Milipore 0.22 µm), sendo a fração líquida armazenada em frascos âmbar, devidamente codificados e mantidos sob refrigeração. Ao final de cada experimento, as amostras armazenadas foram liquefeitas a temperatura ambiente e diluídas em água deionizada para a análise do consumo de acetato pela cromatografia de íons.

Para a cromatografia de íons foi utilizado um equipamento Metrohm (Herisau, Suíça), equipado com detector de condutividade e coluna Metrosep Ácidos Orgânicos

(copolímero de poliestireno/divinilbenzeno, com partículas de 9µm) de dimensões 250 x 7,8 mm. O volume de injeção foi de 196 µL. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico de 0,5 mM com vazão de 0,5 mL por minuto. A curva padrão foi construída entre 5 e 100 ppm de acetato de sódio.

#### **4.2.7.4. Determinação da concentração de nitrogênio total**

A determinação da concentração de nitrogênio total nas amostras foi realizada como descrito na seção 3.2.7.4.

#### **4.2.7.5. Determinação do teor de lipídios**

Foi utilizado o método de extração Bligh e Dyer (Bligh e Dyer, 1959) com prévia digestão ácida e quantificação gravimétrica para a determinação do teor de lipídeos presente na biomassa.

O meio de cultivo foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos, o precipitado foi re-suspendido em água destilada e lavado duas vezes. A biomassa obtida na centrifugação foi congelada a -4°C por 48 horas e depois liofilizada a uma temperatura média de -34°C, pressão de vácuo de 80 µm de Hg durante aproximadamente 24 horas, posteriormente a biomassa liofilizada sofreu uma digestão ácida a fim de romper as paredes celulares.

##### **4.2.7.5.1. Digestão ácida**

Foi pesado em tubos de ensaio 400 mg de biomassa seca e adicionado 5 ml de HCl 2 mol.L<sup>-1</sup>. A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida por 1 hora em banho a 80°C. Depois de retirados do banho, os tubos foram resfriados em água a temperatura ambiente e centrifugados a 2000 rpm durante 15 minutos para separar a biomassa e o resíduo do ácido. O resíduo de ácido foi retirado utilizando uma seringa de vidro com agulha longa.

##### **4.2.7.5.2. Extração de lipídios**

Para a extração de lipídios foi adicionado 4 ml de metanol à biomassa digerida, posteriormente levada à agitação em vórtex e transferida a suspensão para um tubo Falcon de 15 ml. Foi adicionado à suspensão 2 ml de clorofórmio e novamente agitado

em vórtex por 2 minutos, esta operação foi realizado 2 vezes. Posteriormente foram adicionados 3,6 ml de água destilada e agitado em vórtex por 2 minutos. As fases foram separadas por centrifugação por 15 minutos a 2000 rpm. Após a centrifugação, foi obtido um sistema trifásico composto por uma fase inferior (lipídios dissolvidos em clorofórmio), uma fase interfacial sólida que é a biomassa e uma fase líquida superior composta de metanol e água. A fase inferior foi transferida com seringa de vidro para um balão de fundo redondo já pesado. Para a re-extração dos lipídios que ainda estão na biomassa, foi adicionado 4 ml da solução 10% v/v de metanol em clorofórmio às fases que restaram no tubo Falcon e agitado em vórtex por 2 minutos. Esta mistura foi novamente centrifugada por 15 minutos a 2000 rpm, e a fase inferior transferida ao balão juntamente com o primeiro extrato. Foram feitas duas re-extrações. O clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório (75°C sob vácuo de até 30 polegadas) e o resíduo seco em estufa a 60°C por aproximadamente 24 horas até peso constante. O teor de lipídios final foi quantificado gravimetricamente.

#### **4.2.8. Modelos matemáticos**

Os modelos de crescimento celular utilizados foram os mesmos apresentados na Tabela 3.3 (seção 3.2.8.1). E os modelos de consumo de substrato foram os mesmos apresentados na Tabela 3.4 (seção 3.2.8.2). A resolução dos modelos, bem como a validação dos mesmos foi realizada baseada na metodologia descrita na seção 3.2.8.3.

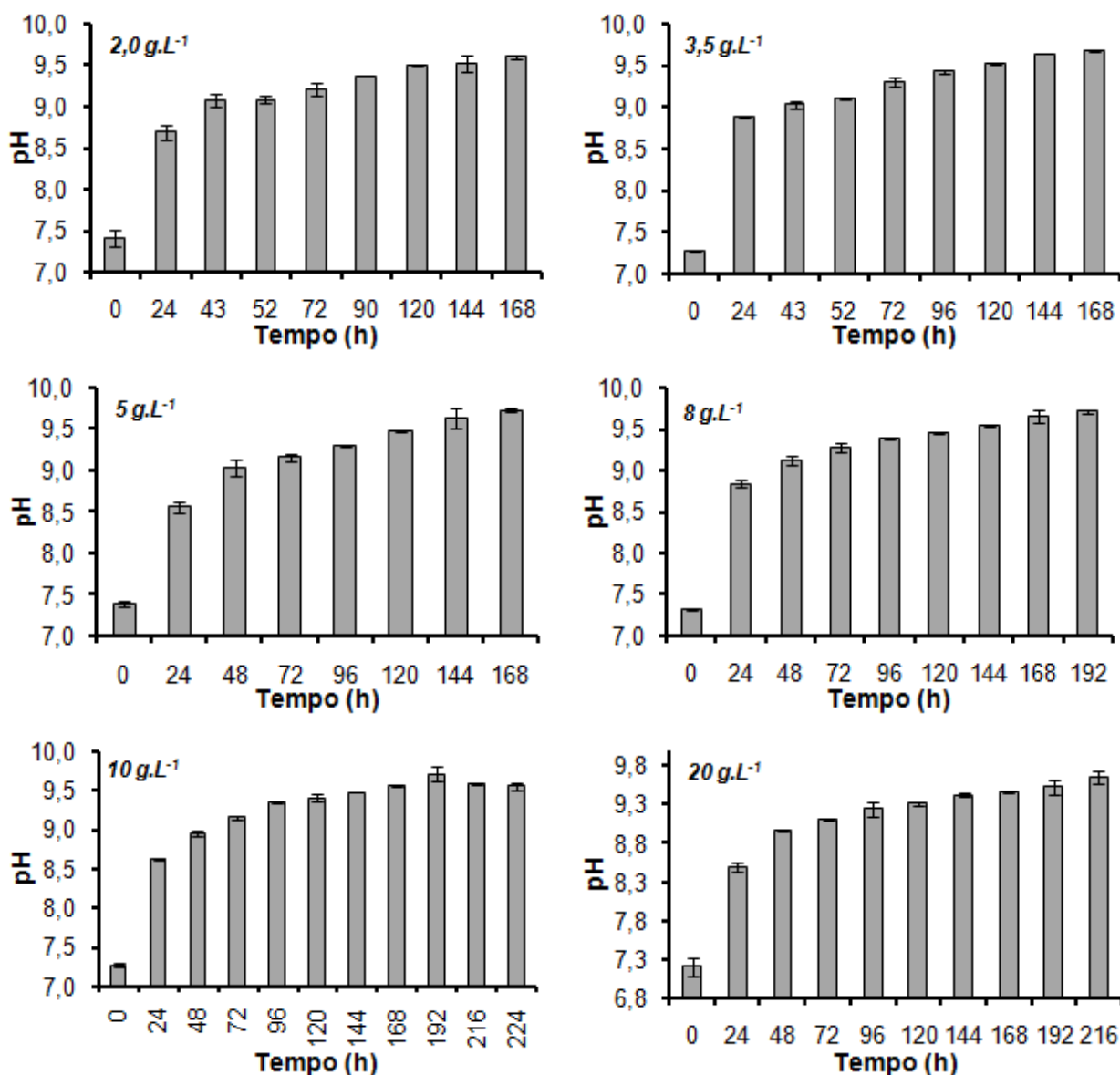
#### **4.2.9. Resultados e discussão**

#### **4.2.10. Cultivos em shaker**

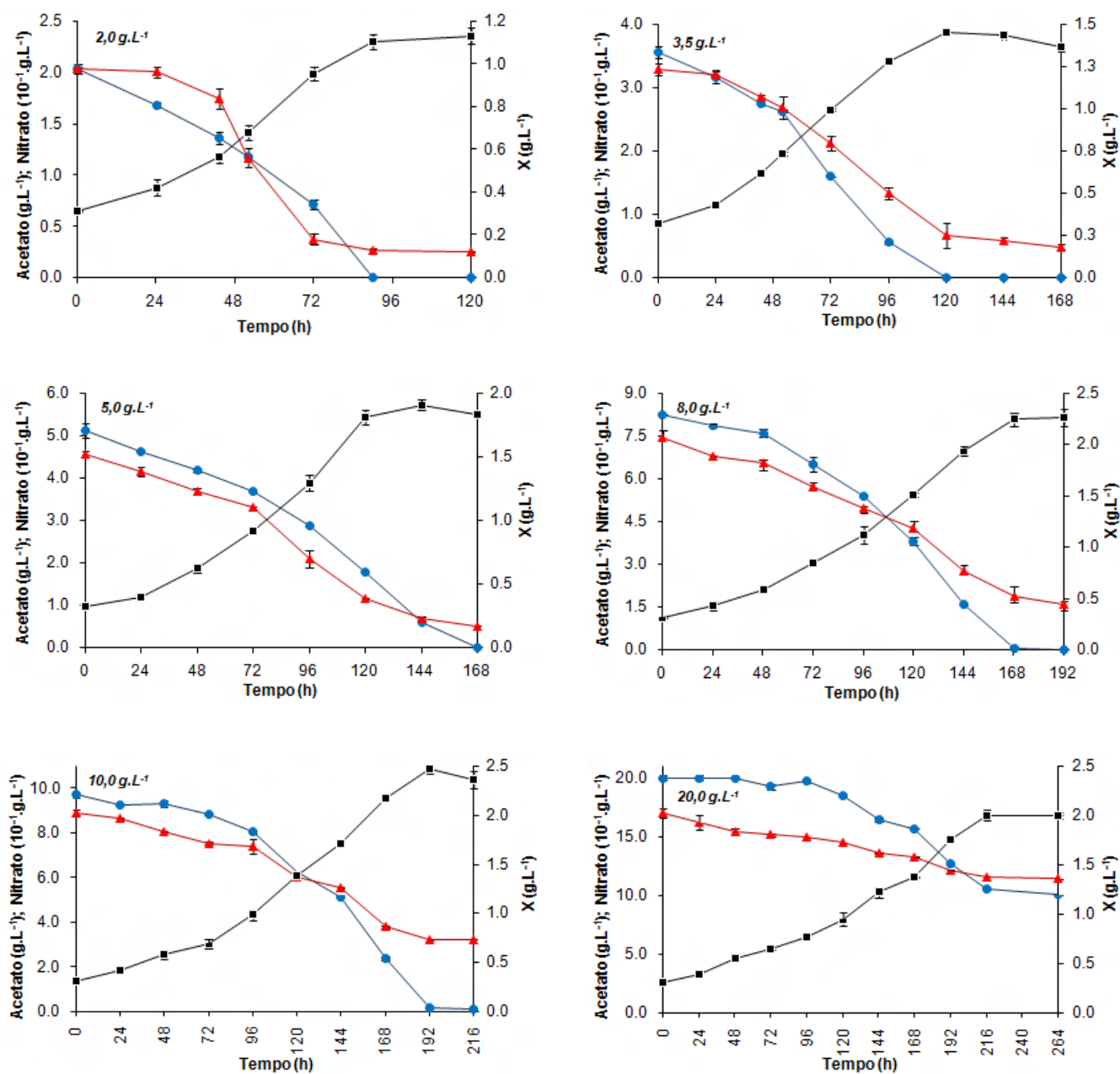
Com o objetivo de investigar a influência da concentração inicial de acetato na produção de biomassa por *Chlorella vulgaris*, foram realizados cultivos em seis diferentes concentrações de acetato: 2; 3,5; 5; 8; 10 e 20 g.L<sup>-1</sup>. A única fonte de nitrogênio presente no meio de cultivo foi o nitrato de sódio, sendo este utilizado no preparo dos meios de cultivo proporcionalmente a concentração de acetato utilizada a fim de manter uma razão C/N de 20 em todos os cultivos.

Para cada concentração foram obtidos os perfis de pH (Figura 4.1) e cinéticas de crescimento de biomassa e consumos de acetato de sódio e nitrato (Figura 4.2).

Por meio dos perfis de pH (Figura 4.1), verifica-se uma alcalinização do meio de cultivo ao longo de todos os experimentos realizados, chegando a até 9,72 para o cultivo de 5 g.L<sup>-1</sup> de acetato, por exemplo. Este comportamento de aumento de pH em cultivos heterotróficos com acetato de sódio foi observado por outros autores que trabalharam com o mesmo tipo de cultivo (Perez-Garcia *et al.*, 2010; Chen e Johns, 1994).



**Figura 4.1.** Perfis de pH dos ensaios realizados com diferentes concentrações iniciais de acetato.



**Figura 4.2.** Perfis de crescimento celular (-■-), consumo de acetato (-●-) e consumo de nitrato (-▲-) dos ensaios realizados com diferentes concentrações iniciais de acetato.

Através dos perfis de crescimento celular (Figura 4.2) observa-se que o cultivo iniciado com 2 g.L<sup>-1</sup> de acetato alcançou 1,13 g.L<sup>-1</sup> de biomassa final em 5 dias de crescimento. A concentração final de biomassa alcançou aproximadamente 2,5 g.L<sup>-1</sup>

quando 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato foram utilizados inicialmente em 8 dias de cultivo, ou seja, com um aumento de 5 vezes na quantidade de substrato, conseguiu-se um aumento celular de mais de 2 vezes, com uma diferença de três dias entre os cultivos realizados.

Portanto, em termos de produção de biomassa, o melhor desempenho observado dentre os sistemas analisados ocorreu com a concentração de acetato inicial de 10 g.L<sup>-1</sup>, alcançando 2,5 g.L<sup>-1</sup> de biomassa final. De uma forma geral estes resultados indicam que o aumento na concentração inicial de acetato nos cultivos proporcionou aumento da produção de biomassa, até a concentração inicial de acetato de 10 g.L<sup>-1</sup>.

Para a concentração (20 g.L<sup>-1</sup>) observou-se uma menor concentração máxima de biomassa final (2,0 g.L<sup>-1</sup>) caracterizando assim a inibição por efeito do substrato sobre o crescimento da *C. vulgaris* em concentrações iniciais de acetato igual ou superiores a 20 g.L<sup>-1</sup>. Observou-se ainda que apenas no experimento de 20 g.L<sup>-1</sup> de acetato o substrato não foi consumido totalmente, neste caso apenas 47,7% do acetato presente no meio de cultivo foi consumido.

Através dos perfis de consumo de nitrato (Figura 4.2) verificou-se que em nenhum dos ensaios o nitrogênio foi consumido totalmente. A partir desta análise foi possível concluir que este substrato foi adicionado em excesso, favorecendo o crescimento celular (Fontenot *et al.*, 2006).

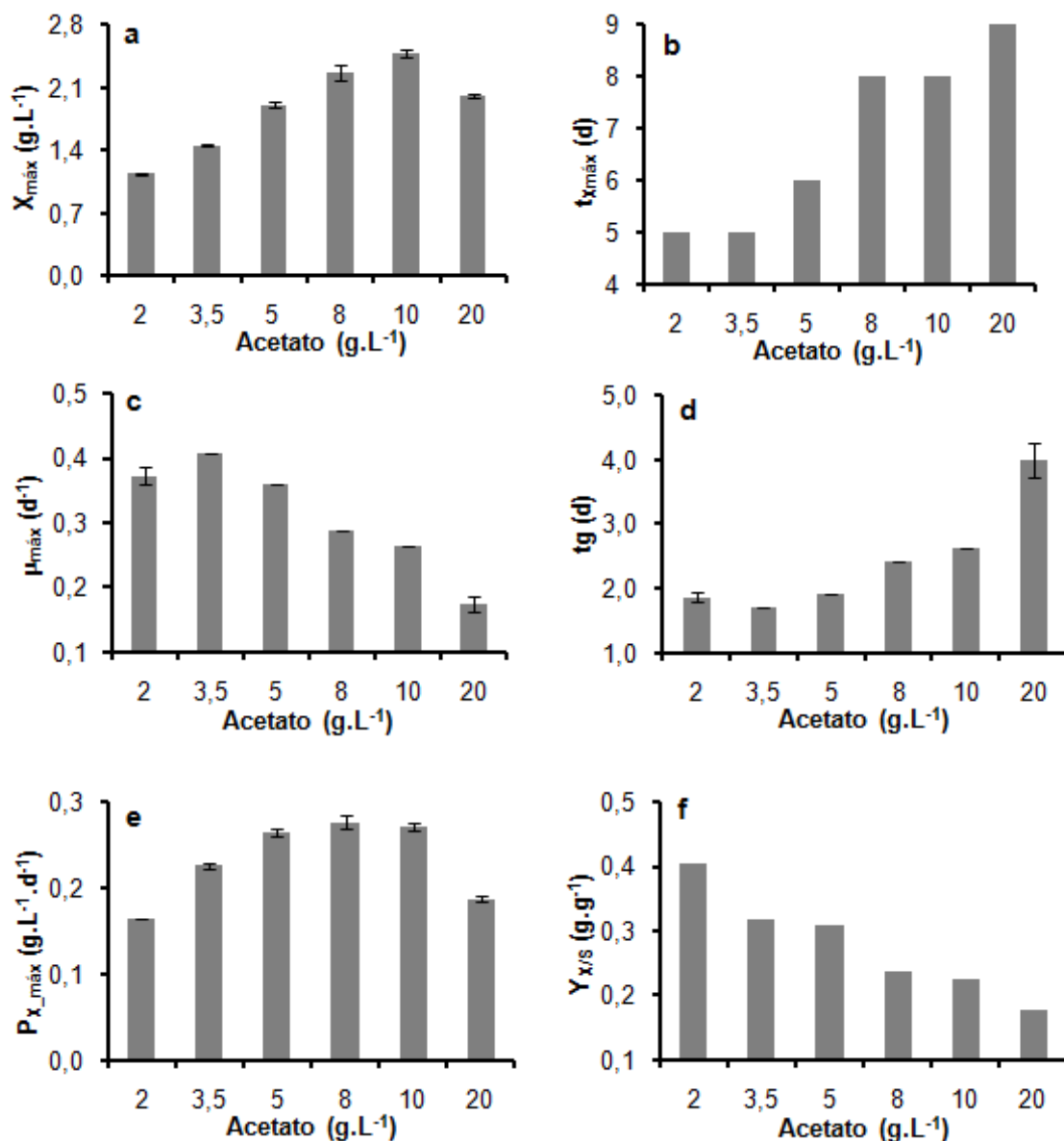
Os parâmetros cinéticos de crescimento celular da *C. vulgaris* nas diferentes concentrações de acetato avaliadas são comparados na Tabela 4.2 e Figura 4.3. Observa-se que a concentração de acetato promoveu um efeito significativo sobre todos os parâmetros cinéticos.

Foi observado que a concentração máxima de biomassa (Figura 4.3-a) aumenta de 1,13 para 2,47 g.L<sup>-1</sup>, com o aumento da concentração de acetato de 2 para 10 g.L<sup>-1</sup>. Entretanto, ao aumentar ainda mais a concentração de acetato no meio (para 20 g.L<sup>-1</sup>), o  $X_{m\acute{a}x}$  diminui para 2 g.L<sup>-1</sup>. Esta concentração inicial de acetato ainda é responsável pelos menores  $\mu_{m\acute{a}x}$ ,  $P_{m\acute{a}x}$  e  $Y_{X/S}$ , caracterizando inibição pelo substrato.

**Tabela 4.2.** Parâmetros cinéticos de crescimento celular dos cultivos realizados.

Parâmetro	Concentração de Acetato (g.L <sup>-1</sup> )					
	2	3,5	5	8	10	20
$X_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	1,13 ± 0,03	1,45 ± 0,02	1,91 ± 0,04	2,26 ± 0,08	2,47 ± 0,04	2,00 ± 0,03
$\mu_{max}$ (d <sup>-1</sup> )	0,372 ± 0,014	0,408 ± 0,000	0,360 ± 0,000	0,288 ± 0,000	0,264 ± 0,000	0,174 ± 0,012
$tg$ (d)	1,87 ± 0,07	1,70 ± 0,00	1,93 ± 0,00	2,41 ± 0,00	2,63 ± 0,00	4,0 ± 0,26
$t_{X_{max}}$ (d)	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00
$P_{x_{m\acute{a}x}}$ (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,165 ± 0,001	0,226 ± 0,004	0,264 ± 0,004	0,276 ± 0,007	0,271 ± 0,005	0,188 ± 0,003
$X_s$ (%)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,1	47,7 ± 0,5
$Y_{X/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,40 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,18 ± 0,00

Densidade celular máxima ( $X_{max}$ ); velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ); tempo de geração ( $tg$ ); tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima ( $t_{X_{max}}$ ); produtividade celular máxima ( $P_{x_{m\acute{a}x}}$ ); conversão global de substrato ( $X_s$ ); fator de conversão de substrato em células: ( $Y_{X/s}$ ).



**Figura 4.3.** Comparação em forma gráfica dos principais parâmetros cinéticos. Sendo: **a.**  $X_{\max}$  (densidade celular máxima); **b.**  $t_{x\max}$  (tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima); **c.**  $\mu_{\max}$  (velocidade máxima específica de crescimento); **d.**  $t_g$  (tempo de geração); **e.**  $P_{\max}$  (produtividade celular máxima) e **f.**  $Y_{x/s}$  (rendimento de substrato em células).

Foi verificado que a máxima concentração celular (2,47 g.L<sup>-1</sup>) foi atingida no cultivo utilizando 10g.L<sup>-1</sup> de acetato (Figura 4.3-a), sendo necessários 8 dias para a



obtenção dessa concentração de células (Figura 4.3-b). Os tempos para obtenção de  $X_{m\acute{a}x}$  nos outros ensaios variaram entre 5 e 9 dias (Figura 4.3-b).

A microalga testada apresentou maiores valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  (Figura 4.3-c) nos ensaios de 2 a 5 g.L<sup>-1</sup> de acetato inicial, sendo 0,41d<sup>-1</sup> o valor máximo obtido (3,5 g.L<sup>-1</sup>). Por sua vez, o tempo de geração possui perfil inverso, sendo obtidos mínimos valores nos ensaios de 2 a 5 g.L<sup>-1</sup> de acetato (Figura 4.3-d).

Máximos valores de  $P_{m\acute{a}x}$  foram obtidos entre as concentrações de 3,5 e 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato, sendo reduzido na concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> (Figura 4.3-e).

O rendimento de substrato em células (Figura 4.3-f) também foi afetado pela concentração inicial de acetato, tendo maior valor para a menor concentração inicial de acetato testada (2g.L<sup>-1</sup>), chegando a 0,40 g<sub>acetato</sub>/g<sub>biomassa</sub>, diminuindo exponencialmente com o aumento da concentração inicial de substrato.

Segundo os dados cinéticos obtidos é possível utilizar concentrações iniciais de acetato de até 10 g.L<sup>-1</sup>, concentrações acima de 20 g.L<sup>-1</sup> apresentam uma repressão importante no crescimento.

Liang e colaboradores (2009), também utilizando o acetato como substrato para o cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* #259, a partir de 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio, obtiveram 0,99 g.L<sup>-1</sup> de biomassa máxima final, em 12 dias, obtendo assim uma produtividade de 0,087 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (Tabela 4.3). O mesmo valor de produtividade (0,087 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foi obtido por Gladue e Maxey (1994), também cultivando a *C. vulgaris* #259 com acetato de sódio numa concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 4.3).

As produtividades obtidas no presente trabalho variaram entre 0,165 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para o cultivo que iniciou com 2 g.L<sup>-1</sup> de acetato e 0,276 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para o cultivo que utilizou 8 g.L<sup>-1</sup> deste substrato, sendo todas superiores as produtividades alcançadas por Liang *et al.* (2009) e Gladue e Maxey (1994). Já o maior valor de biomassa final ocorreu no cultivo que iniciou com 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio, que chegou a 2,5 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 8 dias, valor mais de duas vezes maior e num tempo menor do que os 0,99 g.L<sup>-1</sup> em 12 dias obtido por Liang e colaboradores (2009).

Concentração final de biomassa mais alta (3,06 g.L<sup>-1</sup>) e em menor tempo (3 dias) foi obtida no trabalho de Heredia-Arroyo *et al.* (2011), que cultivou a *C. vulgaris* 2714 com acetato de sódio, porém, com 20,5 g.L<sup>-1</sup> deste substrato, e em regime de mixotrofia (Tabela 4.3). A concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> de acetato foi inibitória para o crescimento da *C. vulgaris* em nosso trabalho.

**Tabela 4.3.** Estudos em cultivo heterotrófico com *C. vulgaris* utilizando acetato de sódio como fonte de carbono.

Referência	Cepa	Condições de cultivo	$X_{máx}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$P_{máx}$ (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	$\mu_{máx}$ (d <sup>-1</sup> )	$t_{xmáx}$ (d)
Presente trabalho	<i>C. vulgaris</i> CPCC90	Heterotrofia Shaker 26°C, 140 rpm S=3,5 g.L <sup>-1</sup>	1,45	0,226	0,408	5
Gladue e Maxey, (1994)	<i>C. vulgaris</i> #259	Heterotrofia S=10,0 g.L <sup>-1</sup>	-	0,087	-	-
Liang <i>et al.</i> (2009)	<i>C. vulgaris</i> #259	Heterotrofia Shaker T. ambiente 150 rpm S=10 g.L <sup>-1</sup>	0,99	0,087	-	12
Heredia-Arroyo <i>et al.</i> (2011)	<i>C. vulgaris</i> 2714	Mixotrofia Shaker 26°C, 160 rpm S=20,5 g.L <sup>-1</sup>	3,06	-	-	3
Perez-Garcia <i>et al.</i> (2011)	<i>C. vulgaris</i> 2714	Heterotrofia Shaker 28±1°C, 120 rpm S=10 g.L <sup>-1</sup>	>11x10 <sup>6</sup> Cél./ml	-	0,498	5
Yeh <i>et al.</i> (2012)	<i>C. vulgaris</i> ESP-31	Mixotrofia Fotobiorreator 25°C, 300 rpm S=13,67g.L <sup>-1</sup>	3,6	0,28	-	12

S - substrato (acetato de sódio); As composições dos meios de cultivo se encontram no Anexo 8.1.

Trabalhando com esta mesma cepa, *C. vulgaris* 2714, Perez-Garcia *et al.* (2011), em heterotrofia, com 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio, obtiveram uma velocidade máxima específica de crescimento de 0,498 d<sup>-1</sup> (Tabela 4.3). O presente trabalho obteve uma velocidade máxima específica de crescimento de 0,408 d<sup>-1</sup> no cultivo iniciado com 3,5 g.L<sup>-1</sup> de acetato, valor este que fica muito próximo ao alcançado por Perez-Garcia *et al.*

(2011). Porém, utilizando 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato, a velocidade máxima específica de crescimento ficou em 0,264 d<sup>-1</sup> em nosso trabalho.

Yeh *et al.* (2012) cultivando a *C. vulgaris* ESP-31, com uma concentração de acetato de sódio de 13,67 g.L<sup>-1</sup>, em mixotrofia, alcançou densidade celular máxima de 3,6 g.L<sup>-1</sup> e produtividade de 0,28 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em 12 dias. A concentração de acetato do nosso trabalho que mais se aproxima de 13,67 g.L<sup>-1</sup>, a título de comparação, é 10 g.L<sup>-1</sup>, ensaio este que obteve  $X_{máx}$  de 2,47 g.L<sup>-1</sup> e  $P_{máx}$  de 0,271 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em 8 dias. Os mesmos autores encontraram um teor de lipídios de 24,3±2,5% no cultivo mencionado.

O teor de lipídios da biomassa final coletada no cultivo de 8 g.L<sup>-1</sup> de acetato do nosso trabalho, foi de 25,11% de lipídios, resultando numa produtividade de lipídios de 0,081±0,004 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e num rendimento de substrato em lipídios de 0,071 g<sub>lipídios</sub>/g<sub>acetato</sub>. Resultado de teor de lipídios bem próximo do obtido por Yeh *et al.* (2012).

Já Liang *et al.* (2009), cultivando em regime heterotrófico a *C. vulgaris* #259 com acetato de sódio, encontrou um maior teor de lipídios (31±1%), porém Heredia-Arroyo *et al.* (2011) obtiveram 14,23 ± 1,37% cultivando outra cepa de *C. vulgaris* 2714 com o mesmo substrato. O que mostra que o teor de lipídios obtido no presente trabalho está dentro da faixa normalmente encontrada para cepas de *C. vulgaris* cultivadas em mixotrofia ou heterotrofia com acetato de sódio.

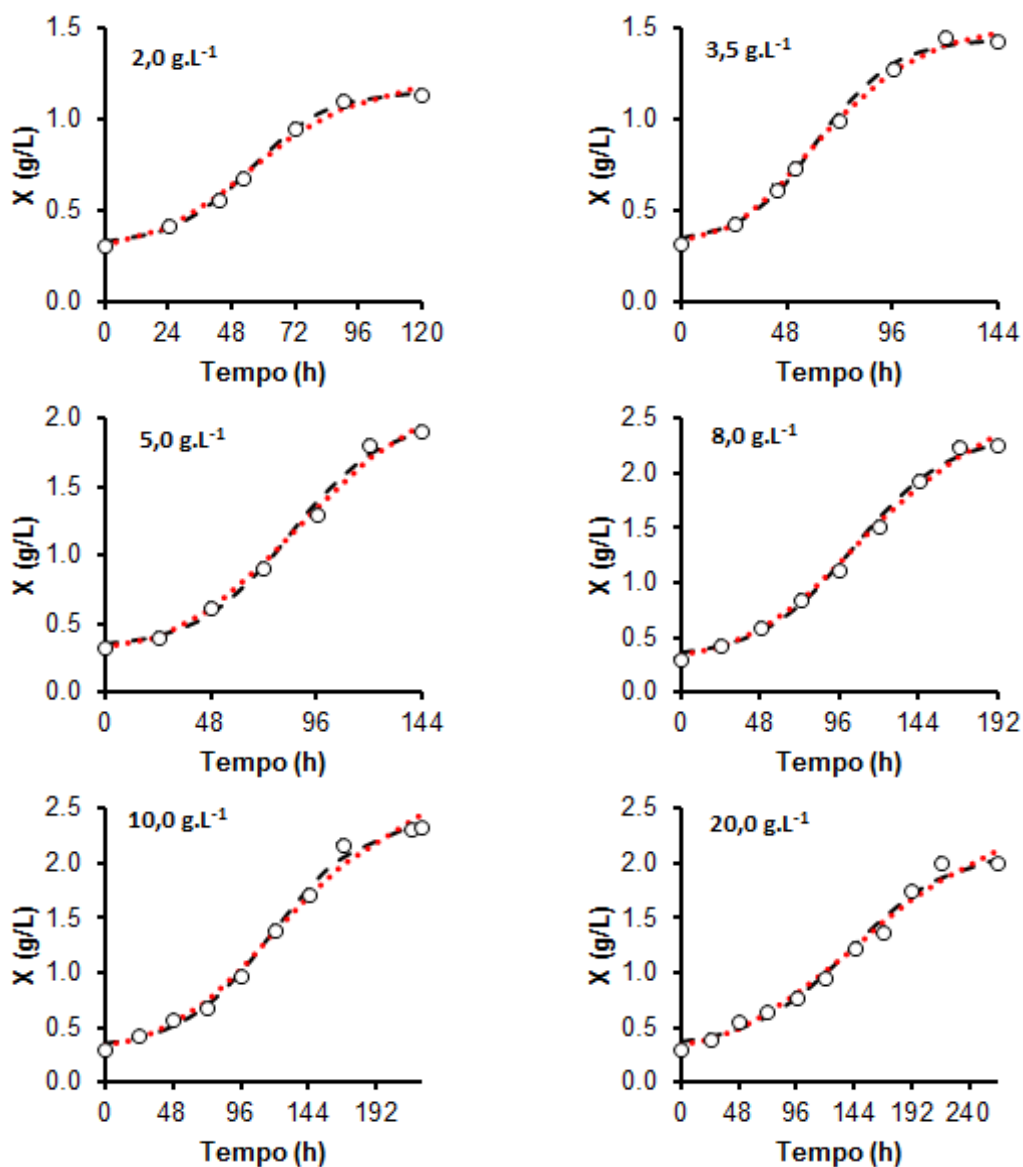
Comparando a produtividade de lipídios, o valor encontrado no nosso trabalho (0,081 ± 0,004 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foi o triplo do encontrado por Liang *et al.* (2009), 0,027 ± 0,001 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, e quase o dobro do que o obtido por Yeh *et al.* (2012) 0,049 ± 0,003 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, porém menor do que a produtividade de lipídios alcançada no trabalho de Heredia-Arroyo *et al.* (2011) que foi 0,145 ± 0,014 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Como nos ensaios com glicose, em cada ponto de amostragem foi verificada a axenia dos cultivos, por observação visual em microscópio, e certificada a ausência de contaminação em todos os experimentos realizados.

### 4.3.2. Modelos matemáticos

#### 4.3.2.1. Modelos de crescimento celular

A Figura 4.4 apresenta o ajuste dos modelos Logístico e Gompertz Modificado testados aos dados experimentais para as diferentes concentrações iniciais de acetato analisadas (2; 3,5; 5; 8; 10 e 20 g.L<sup>-1</sup>).



**Figura 4.4.** Ajuste dos modelos de crescimento celular aos dados experimentais. Sendo: (- - -) LO, (...) GM e (o) dados experimentais.

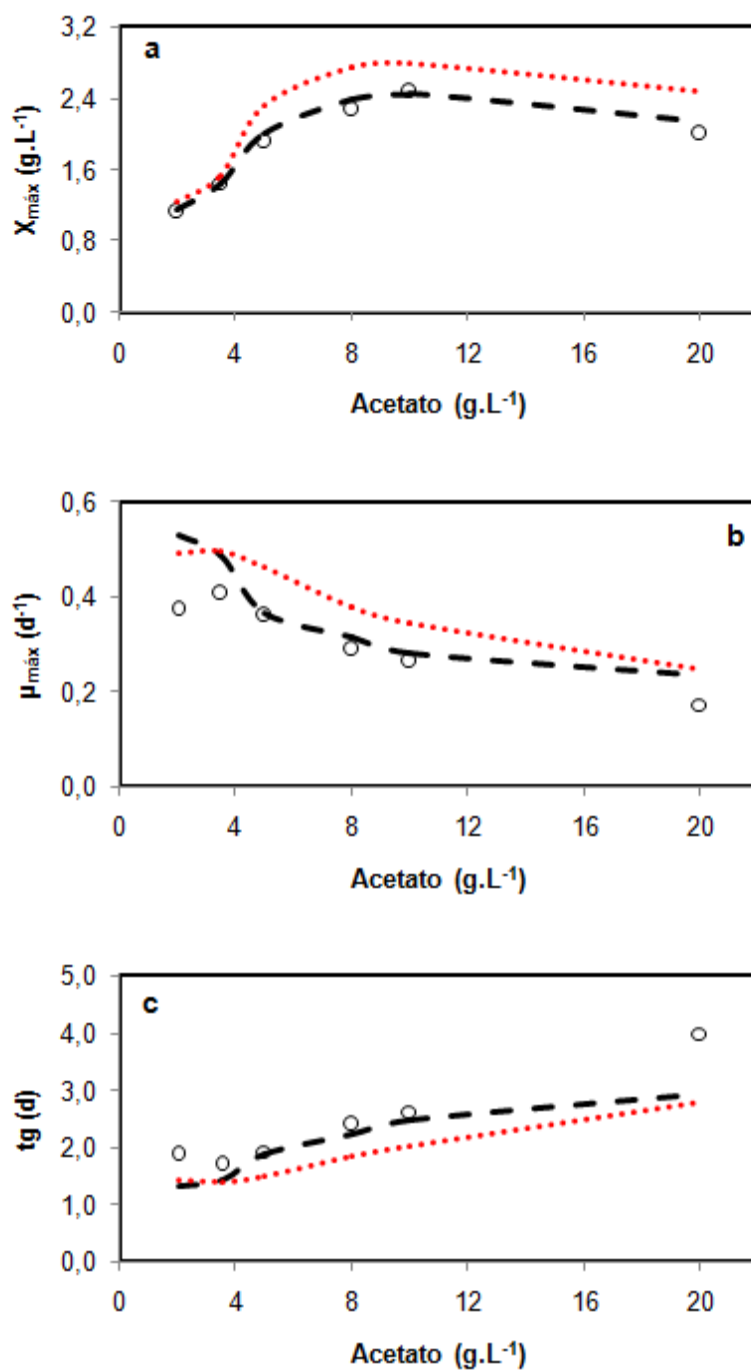
De forma geral foi verificado que ambos os modelos apresentaram aderência satisfatória. A Tabela 4.4 apresenta os resultados dos parâmetros de validação dos modelos aplicados aos dados experimentais mencionados.

**Tabela 4.4.** Resultados dos parâmetros de Validação.

Acetato (g.L <sup>-1</sup> )	Parâmetro	Modelos	
		LO	GM
2,0	Bias	1,005	1,001
	Exatidão	1,025	1,036
	%SEP	0,004	0,005
	RMSE	0,032	0,036
	R <sup>2</sup>	0,995	0,994
3,5	Bias	1,002	1,002
	Exatidão	1,017	1,017
	%SEP	0,002	0,002
	RMSE	0,020	0,020
	R <sup>2</sup>	0,999	0,999
5,0	Bias	1,011	1,004
	Exatidão	1,049	1,034
	%SEP	0,006	0,004
	RMSE	0,059	0,037
	R <sup>2</sup>	0,993	0,997
8,0	Bias	1,010	1,005
	Exatidão	1,049	1,038
	%SEP	0,005	0,003
	RMSE	0,065	0,042
	R <sup>2</sup>	0,992	0,996
10,0	Bias	1,007	1,004
	Exatidão	1,049	1,058
	%SEP	0,005	0,005
	RMSE	0,069	0,064
	R <sup>2</sup>	0,991	0,992
20,0	Bias	1,008	1,005
	Exatidão	1,068	1,061
	%SEP	0,008	0,006
	RMSE	0,084	0,068
	R <sup>2</sup>	0,982	0,988

Foi verificado que os dois modelos testados podem ser utilizados para representar o crescimento celular da *Chlorella vulgaris* cultivada em acetato (Tabela 4.4). Esse resultado é enfatizado pela comparação entre os parâmetros  $X_{\text{máx}}$ ,  $\mu_{\text{máx}}$  e  $t_g$

calculados pelos modelos LO e GM e os obtidos experimentalmente, apresentados na Figura 4.5 a( $X_{\text{máx}}$ ), b ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e c (tg).



**Figura 4.5.** Comparação entre os parâmetros  $X_{\text{máx}}$ ,  $\mu_{\text{máx}}$  e tg calculados pelos modelos LO e GM e os obtidos experimentalmente para as seis concentrações de acetato avaliadas. Sendo: (- - -) LO, (...) GM e (o) dados experimentais.

O modelo LO foi o que apresentou o menor desvio médio em relação aos dados experimentais para os três parâmetros analisados (Tabela 4.5), por isso este modelo foi escolhido como o mais indicado para representar os dados experimentais. Resultados similares foram obtidos para a modelagem dos cultivos com glicose.

**Tabela 4. 5.** Desvios absolutos entre os valores de  $X_{máx}$ ,  $\mu_{máx}$ , e  $tg$  experimentais e calculados pelos modelos LO e GM.

Concentração acetato (g.L <sup>-1</sup> )	Desvio absoluto					
	$X_{máx}$		$\mu_{máx}$		$tg$	
	LO	GM	LO	GM	LO	GM
2	0,027	0,104	0,155	0,118	0,551	0,445
3,5	0,011	0,075	0,077	0,089	0,270	0,299
5	0,101	0,418	0,007	0,101	0,035	0,425
8	0,115	0,481	0,025	0,089	0,191	0,577
10	0,028	0,314	0,017	0,079	0,157	0,606
20	0,150	0,468	0,062	0,076	1,065	1,207
<b>Desvio médio</b>	<b>0,062</b>	<b>0,266</b>	<b>0,049</b>	<b>0,079</b>	<b>0,324</b>	<b>0,508</b>

#### 4.3.2.2. Modelos de consumo de substrato

Os mesmos modelos de consumo de substrato utilizados para a glicose foram utilizados visando determinar a concentração de substrato que irá promover máximas taxas de crescimento em função dos parâmetros cinéticos conhecidos como máxima velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{máx}$ ), constante de saturação ( $K_s$ ) e constante de inibição ( $K_I$ ).

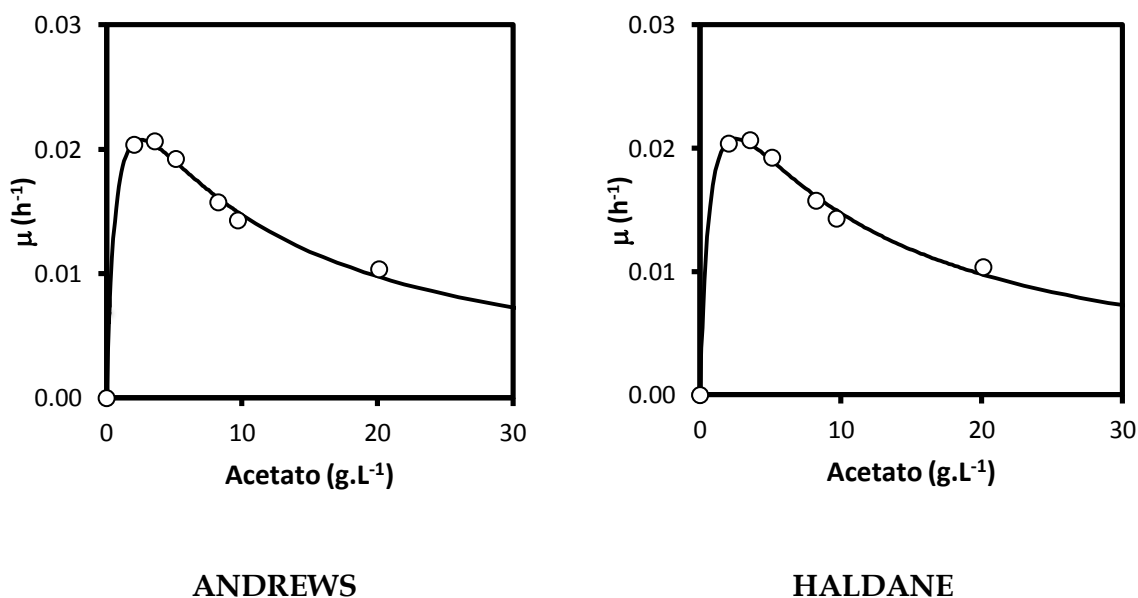
Com estes testes foi possível avaliar o perfil da máxima taxa específica de crescimento celular obtida cultivando-se a *Chlorella vulgaris* em diferentes

concentrações iniciais de acetato e nas condições de operação citadas (26°C, 140rpm, meio BBM modificado, razão C/N=20).

A Figura 4.6 apresenta o ajuste dos modelos de consumo de substrato com efeito inibidor aos dados experimentais. A Tabela 4.6 apresenta os resultados dos índices de desempenho para estes ajustes.

A análise das curvas aliada aos resultados dos parâmetros de validação sugere o uso de qualquer um dos modelos para descrever o consumo de acetato pela *Chlorella vulgaris*. Assim, um dos critérios utilizados para a escolha entre esses modelos foi o critério de facilidade de uso. Nesse sentido, o modelo Andrews (Andrews, 1968) foi utilizado para descrever o consumo de acetato pela *Chlorella vulgaris*. Vale ressaltar que este modelo foi selecionado para predizer o consumo de glicose pelo mesmo microrganismo.

Foi calculada a derivada da função em relação ao substrato e igualando o resultado a zero para obtenção do ponto máximo da função.

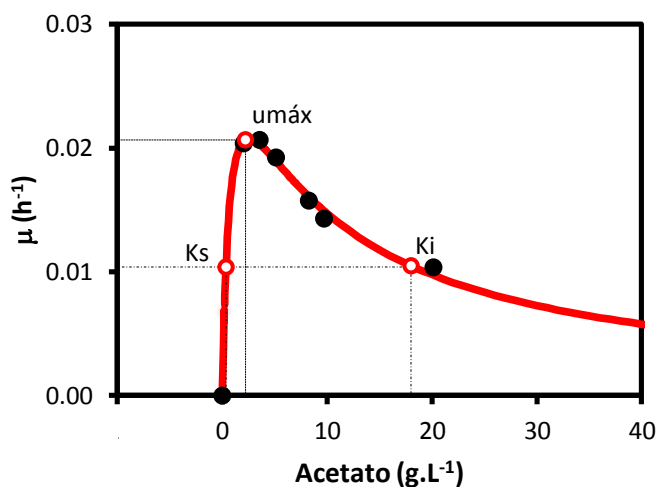


**Figura 4.6.** Ajuste dos modelos de consumo de substrato limitante e inibidor aos dados experimentais de acetato (— Modelo; ○ Experimental).



**Tabela 4.6.** Resultados dos parâmetros de Validação.

Parâmetros	Andrews	Haldane
Bias	1,00	1,00
Exatidão	1,03	1,03
%SEP	2,61	2,61
RMSE	0,00	0,00
R <sup>2</sup>	0,99	0,99



**Figura 4. 7.** Ajuste do modelo Andrews aos dados experimentais de acetato, evidenciando os parâmetros preditos pelo modelo ( — Modelo; • Experimental).

Vale ressaltar que, os valores de  $K_s$  e  $K_i$  correspondem aos limites em que  $\mu = \mu_{máx}/2$ . Assim, trabalhando em concentrações de acetato entre os valores de  $K_s$  e  $K_i$ , a velocidade específica de crescimento será sempre superior à metade do máximo valor possível de ser obtido ( $\mu > \mu_{máx}/2$ ). Contudo, para a obtenção de máximas velocidades específicas de crescimento, a condição de operação do cultivo heterotrófico deve ser mantido em valores próximos ao da concentração que promove  $\mu_{máx}$  ( $S = 3,5 \pm 0,2$  g.L<sup>-1</sup>).

#### 4.3. Conclusões

O acetato de sódio foi consumido pela *C. vulgaris* e sua concentração inicial influenciou o rendimento celular e os parâmetros cinéticos dos cultivos, inibindo em concentrações iniciais igual ou maiores que 20 g.L<sup>-1</sup> de acetato.

A máxima velocidade específica de crescimento celular (0,408 d<sup>-1</sup>) foi obtida no experimento contendo 3,5 ± 0,2 g.L<sup>-1</sup> iniciais de acetato. Em termos de produção de biomassa, o melhor desempenho do sistema ocorreu com a concentração inicial de acetato de 10 g.L<sup>-1</sup>, alcançando aproximadamente 2,5 g.L<sup>-1</sup> de biomassa final. Os maiores valores de produtividade celular (média de 0,27 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) ocorreram nos cultivos em que foram utilizados inicialmente entre 5 e 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato, e o maior fator de conversão de substrato em células (0,40 g.g<sup>-1</sup>) foi alcançado com concentração inicial de 2 g.L<sup>-1</sup> de acetato.

A concentração final de lipídios alcançou 25,11% resultando em uma produtividade de 0,081 g.l<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em massa lipídica, no cultivo com 8 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio.

Os procedimentos adotados no controle da contaminação foram efetivos para a manutenção da axenia dos cultivos.

Os modelos representaram bem os dados experimentais para crescimento celular e consumo de acetato de sódio. Os resultados obtidos pelos modelos indicam que a concentração ótima de acetato de sódio para o cultivo heterotrófico da *C. vulgaris* é 3,5 ± 0,2 g.L<sup>-1</sup>.

#### 4.4. Referências bibliográficas

Andrews, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substance. *Biotechnology and Bioengineering*, v.10, p.707-723, 1968.

Bligh, E. G., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification *Canadian Journal of Physiology*, v.37, p.911 – 917, 1959.

Chen, F., Johns, M. R. Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. *Process Biochemistry*, v.29, p.245-252, 1994.

Gladue, R., Maxey, J. Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, v.6, n.2, p.131-141, 1994.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Roger, R., Bo, H. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*. v.35, p.2245-2253, 2011.

Liang, Y. N., Sarkany, N., Cui, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett.*, v.31, p.1043-9, 2009.

Perez-Garcia, O., Bashan, Y., Puente, M. E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic Growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*, v.47, n.1, p.190-199, 2011.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Basahn, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, v.45, p.11-36, 2010.

Yeh, K. L., Chen, C. Y., Chang, J. S. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Journal Biochem. Engineering*, 2012. doi:10.1016/j.bej.2012.02.006.

## 5. COMPARAÇÃO CINÉTICA DOS CULTIVOS COM GLICOSE E ACETATO DE SÓDIO E AUMENTO DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA UTILIZANDO PROCESSO DE BATELADA ALIMENTADA

### 5.1. Resumo

---

Este capítulo apresenta uma comparação do desempenho cinético dos cultivos com glicose e acetato de sódio apresentados nos capítulos 3 e 4. De forma geral, foi constatada a superioridade da glicose como fonte de carbono, podendo chegar a uma diferença maior que 50% em determinadas concentrações iniciais de substrato e parâmetros cinéticos. Assim, nesse capítulo foi estudado o aumento de produtividade de biomassa de microalgas por batelada alimentada com acetato de sódio, em fermentador com volume de trabalho ampliado a dois litros. No primeiro cultivo foi realizado o controle do pH mantendo-o em 6,8, com o objetivo de verificar a influência da alcalinização do meio ao longo do cultivo. Esta estratégia não produziu melhores resultados do que os anteriormente obtidos em shaker. Já no segundo cultivo, o resultado foi uma concentração final de biomassa de aproximadamente 6,3 g.L<sup>-1</sup>, concentração 2,5 vezes maior do que a alcançada em shaker, que foi 2,5 g.L<sup>-1</sup> quando se trabalhou com 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato. Não obstante, o segundo cultivo também apresentou uma produtividade maior (70%) do que a alcançada nos experimentos realizados em shaker.

---

**Palavras chave:** *Chlorella vulgaris*, batelada alimentada, glicose e acetato de sódio.

## **5.2. Material e métodos**

### **5.2.1. Comparação dos cultivos com glicose e acetato de sódio**

A metodologia utilizada é a mesma já descrita nas seções 3.2 e 4.2 dos capítulos 3 e 4 respectivamente.

### **5.2.2. Condições experimentais do fermentador**

Os cultivos foram conduzidos em um biorreator de 3 litros BioFlo III (New Brunswick Scientific-Edison N.J. U.S.A.), em regime de batelada alimentada. O volume total de trabalho foi fixado em 2 litros, considerando 0,3 g.L<sup>-1</sup> de inóculo inicial. Os cultivos foram realizados a uma temperatura de 26°C, agitação de 150 rpm, aeração de 1 vvm e ausência de luminosidade (a cuba do fermentador foi totalmente coberta com papel pardo).

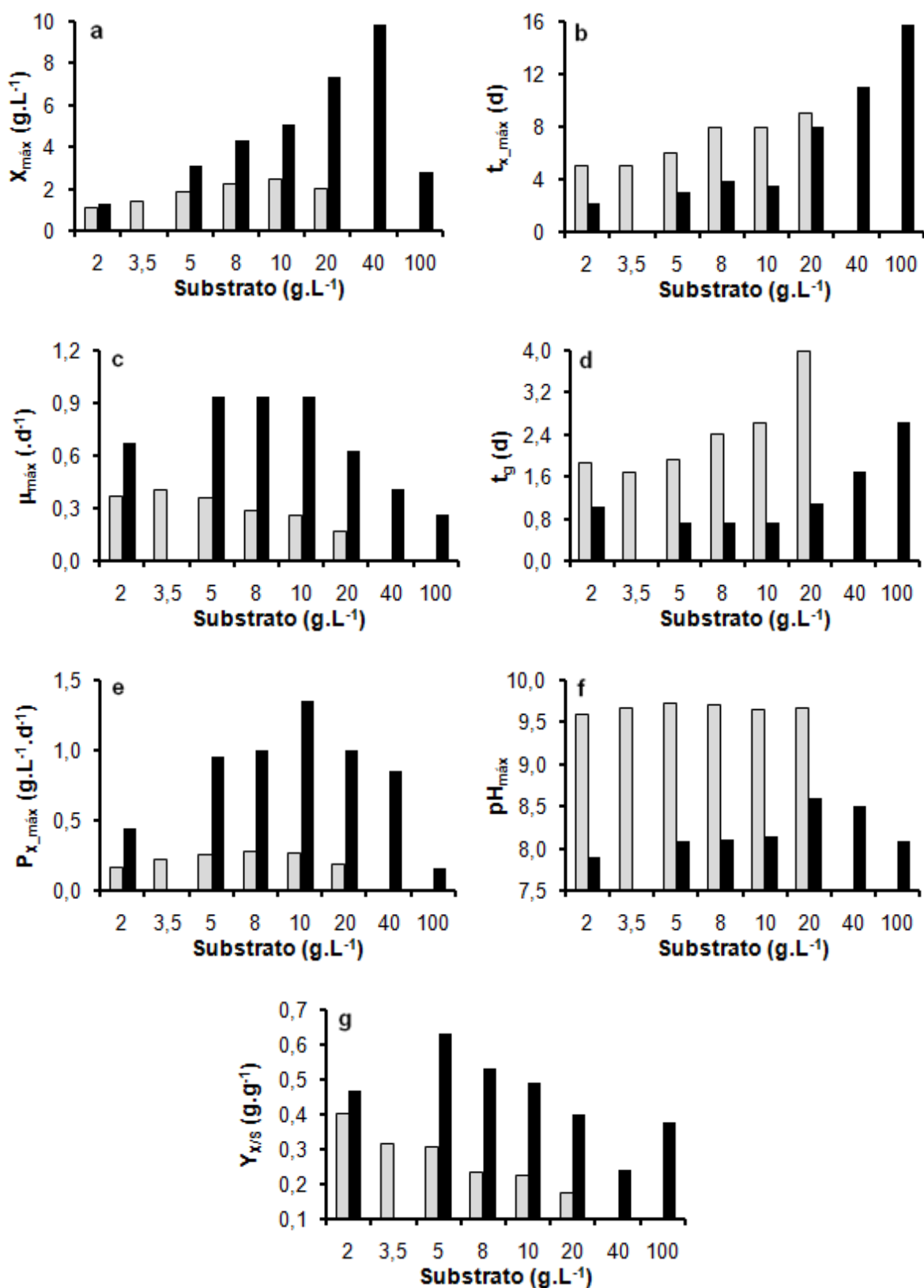
Foram realizados dois experimentos, o primeiro mantendo pH em 6,8 através da adição de solução de ácido clorídrico a uma concentração de 0,5 molar. E outro em batelada alimentada permitindo que o pH variasse livremente. Foram feitas alimentações de meio BBM modificado com acetato de sódio, a fim de não permitir o esgotamento do substrato no fermentador. O meio BBM modificado foi preparado com os sais e o acetato de sódio concentrados 20 vezes, e a razão C/N mantida em 20.

As amostragens foram realizadas assepticamente em espaços regulares de tempo (24 em 24 horas) para o monitoramento dos perfis de pH, consumo de substrato e crescimento celular.

## **5.3. Resultados e discussão**

### **5.3.1. Comparação dos cultivos com glicose e acetato de sódio**

A Figura 5.1 compara os principais parâmetros cinéticos calculados para os cultivos em shaker da *C. vulgaris* utilizando glicose e acetato como fontes de carbono. Os resultados cinéticos dos cultivos de glicose foram apresentados mais detalhadamente na seção 3.3 e os resultados aqui mencionados dos cultivos com acetato de sódio foram apresentados com mais detalhes na seção 4.3.



**Figura 5.1.** Comparação em forma gráfica dos principais parâmetros cinéticos. a.  $X_{\text{máx}}$ ; b.  $t_{x_{\text{máx}}}$ ; c.  $\mu_{\text{máx}}$ ; d.  $t_g$ ; e.  $P_{x_{\text{máx}}}$ ; f.  $pH_{\text{máx}}$ ; g.  $Y_{x/s}$  (■ glicose; ■ acetato).

As velocidades específicas de crescimento da *C. vulgaris*, utilizando acetato de sódio como substrato, foram de 40 a 80% inferiores às obtidas com células que cresceram em meio com glicose (Figura 5.1-c). As concentrações de biomassa finais atingidas também foram superiores em 50% para células crescidas em glicose comparando os ensaios de 10 g.L<sup>-1</sup> de substrato (Figura 5.1-a).

Diferenças entre 30 e 60% também foram observadas no tempo para alcançar a densidade celular máxima (Figura 5.1-b). A maior diferença apresentada ocorreu na produtividade em biomassa, em torno de até 85% (Figura 5.1-e).

Os valores de pH máximo atingidos (Figura 5.1-f) nos ensaios foram significativamente maiores para os cultivos com acetato, que chegaram a valores acima de 9,5. Enquanto os cultivos com glicose permaneceram entre valores de pH máximo entre 8,0 e 8,5. Fato que pode ter refletido na menor produção de biomassa pelos cultivos com acetato, pela alta alcalinidade atingida no meio já nas primeiras 24 horas de cultivo (Figura 5.1-f).

Os resultados dos cultivos contendo glicose foram em geral superiores aos que utilizaram acetato, sendo que nos principais parâmetros cinéticos, como  $\mu_{\text{máx}}$ , tg,  $P_{\text{máx}}$  e  $Y_{X/S}$ , a superioridade da glicose é maior que 50% (Figura 5.1).

A *C. vulgaris* suporta elevadas concentrações de glicose, apresentando inibição por este substrato em 100 g.L<sup>-1</sup>. Entretanto, o acetato de sódio em concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> já promoveu inibição pelo substrato.

Outra explicação para os rendimentos em biomassa terem sido menores utilizando o acetato de sódio, pode ser a diferença da fração de carbono de cada substrato. Enquanto a glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) possui 40% de carbono na molécula, o acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) possui apenas 29,3%, ou seja, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose possui 4 g.L<sup>-1</sup> de carbono, enquanto as mesmas 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio possuem apenas 2,93 g.L<sup>-1</sup> de carbono.

### 5.3.2. Aumento de produtividade de biomassa em fermentador

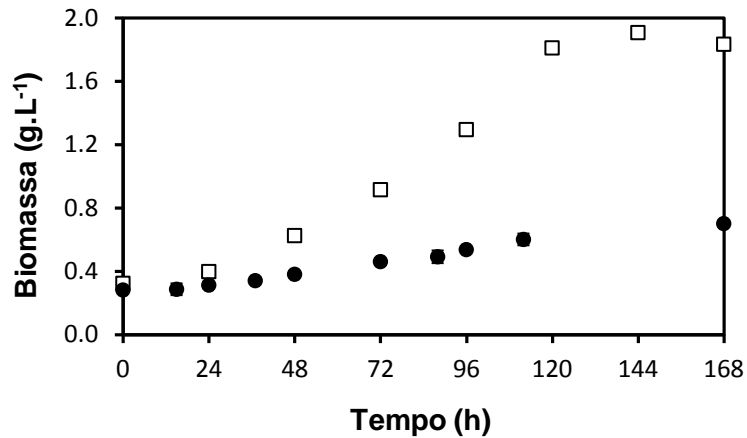
Como concentrações de apenas 20 g.L<sup>-1</sup> de acetato já promovem inibição do crescimento de microalgas, a realização de cultivos em batelada alimentada se justifica, pois, mantendo uma concentração de substrato baixa constante se consegue evitar os efeitos da inibição pelo substrato sobre o crescimento e rendimento do produto final (Schmidt et al., 2005; Xiong et al., 2008).

Portanto, com o objetivo de obter maior produtividade de biomassa, foram propostos dois cultivos em batelada alimentada em fermentador. No primeiro cultivo foi realizado o controle do pH, mantendo-o em 6.8 (valor de pH inicial do meio de cultivo) através da adição de solução de HCl. A manutenção do pH em 6.8 foi proposta com o objetivo de verificar se a forte alcalinização do meio ao longo do cultivo teve influência negativa sobre o crescimento da microalga.

Os resultados do crescimento celular do primeiro cultivo estão apresentados na Figura 5.2. Nesta mesma figura está apresentado o perfil de crescimento celular obtido em shaker para 5 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio (Figura 4.2). De acordo com os dados apresentados nesta figura, nota-se que a estratégia de controle de pH não produziu melhores resultados do que os obtidos em shaker, pelo contrário, a concentração celular final foi menor do que a obtida em shaker.

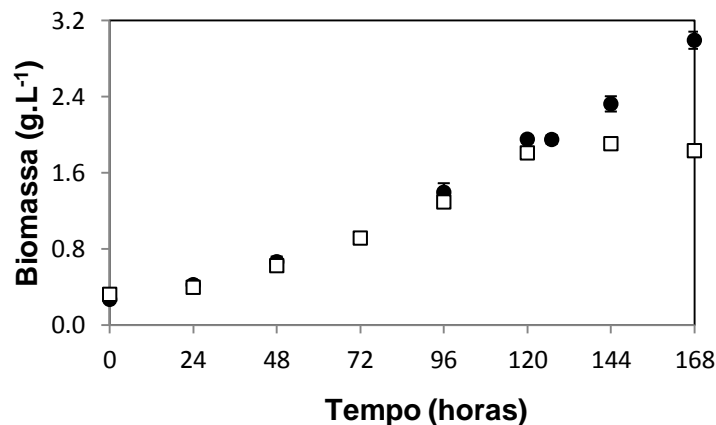
Diversos fatores podem estar associados a este comportamento, um deles é a inibição que pode ser ocasionada pela presença do ácido clorídrico. Nas 168 horas totais de cultivo, foram adicionados 250 ml da solução de ácido clorídrico 0,5 molar para manter o pH em 6,8.





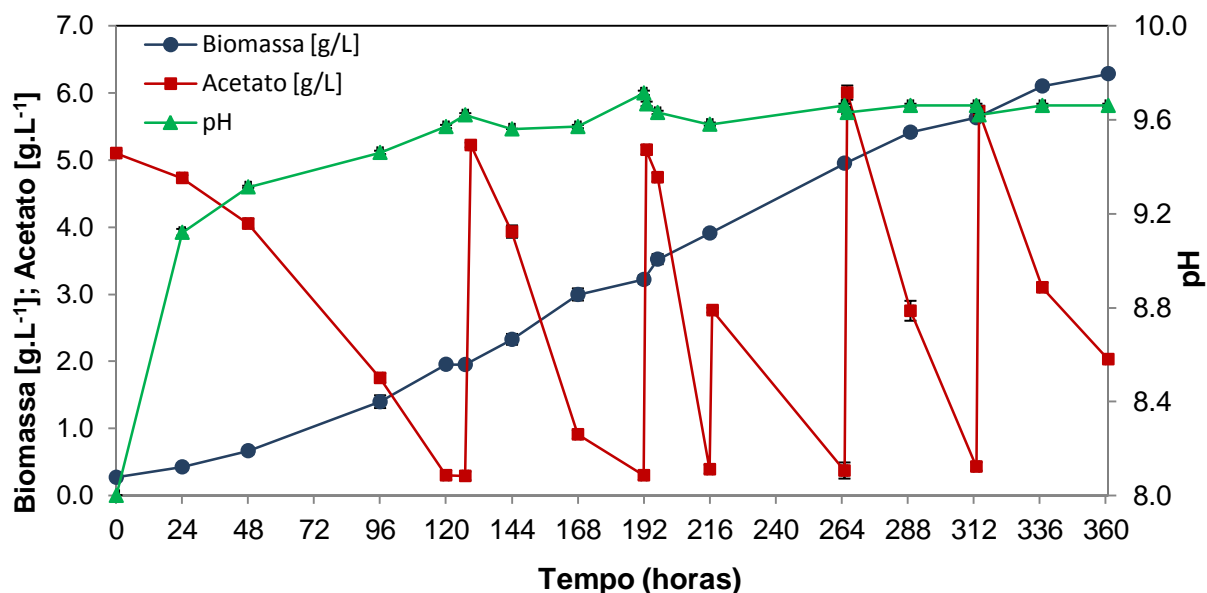
**Figura 5. 2.** Perfil de crescimento celular do primeiro ensaio realizado em fermentador (-●-) e em shaker (-□-). As barras de erro representam o desvio padrão entre as médias dos valores para cada ponto de retirada de amostra.

Baseado neste resultado foi realizado um cultivo em fermentador nas mesmas condições do primeiro, porém, permitindo que o pH do cultivo variasse livremente. Estratégia que se mostrou melhor do que a primeira. Nota-se que nas primeiras 120 horas o desempenho do cultivo foi semelhante ao cultivo nas mesmas condições do shaker (Figura 5.3), que traz as primeiras 168 horas do cultivo em fermentador comparado ao mesmo tempo em shaker.



**Figura 5.3.** Perfil de crescimento celular do segundo ensaio realizado em fermentador (-●-) e em shaker (-□-). As barras de erro representam o desvio padrão entre as médias dos valores para cada ponto de retirada de amostra.

A Figura 5.4 traz o perfil completo de crescimento celular, o perfil de pH e consumo de acetato da batelada alimentada.



**Figura 5. 4.** Perfis de crescimento celular (-●-), pH(-▲-) e consumo de substrato (-■-). As barras de erro representam o desvio padrão entre as médias dos valores para cada ponto de retirada de amostra.

Foram realizadas cinco alimentações, nos pontos T129, T193, T217, T266 e T314 horas, sendo 4 alimentações (T129, T193, T266 e T314) de 100ml de volume de meio concentrado, mais uma alimentação (T217) de 50ml, resultando num volume total de 450ml da solução de alimentação, e num total 45 gramas de acetato. Assim, considerando 2 litros iniciais de concentração 5 g.L<sup>-1</sup>, totaliza aproximadamente 27,5g.L<sup>-1</sup> de acetato.

A biomassa total alcançada no cultivo foi de quase 6,5 g.L<sup>-1</sup>, em 361 horas (15 dias), e a produtividade máxima alcançada foi de 0,40 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Estes foram comparados com os resultados obtidos previamente em shaker (5 e 10g.L<sup>-1</sup> de acetato), agora novamente apresentados na Tabela 5.1 onde todos os parâmetros cinéticos estão descritos a título de comparação.

**Tabela 5.1.** Resultados dos parâmetros cinéticos avaliados.

Parâmetros	$\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )	tg (d)	$P_{x,\text{máx}}$ (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	$X_{\text{máx}}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$t_{x,\text{máx}}$ (d)	$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )
Shaker 5,0 g.L <sup>-1</sup>	0,360	1,93	0,26	1,91	6,0	0,31
Shaker 10,0 g.L <sup>-1</sup>	0,264	2,63	0,27	2,47	8,0	0,23
Batelada alimentada	0,144	4,81	0,40	6,3	15,0	0,23

A biomassa máxima final obtida em fermentador (6,3 g.L<sup>-1</sup>) foi 2,5 vezes maior do que a biomassa máxima obtida em shaker (cultivo de 10g.L<sup>-1</sup> de substrato), a produtividade também foi maior, o dobro da produtividade média alcançada em shaker. O rendimento de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), foi igual ao obtido em shaker no ensaio de 10 g.L<sup>-1</sup> de acetato (Tabela 5.1).

#### 5.4. Conclusões

Foi constatada a superioridade da glicose como fonte de carbono, podendo chegar a uma diferença maior que 50% em determinadas concentrações iniciais de substrato e parâmetros cinéticos.

Foi alcançado um aumento de 70% na produtividade máxima (em relação ao cultivo em shaker), para o acetato, com a batelada alimentada, que também apresentou uma concentração final de biomassa de aproximadamente 6,3 g.L<sup>-1</sup> (total de 27,5 g.L<sup>-1</sup> de acetato), biomassa 2,5 vezes maior do que a melhor concentração alcançada em shaker (com 10g.L<sup>-1</sup> de acetato).

#### 5.5. Referências Bibliográficas

Schmidt, R.A., Wiebe, M.G., Eriksen, N.T. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin producing red alga *Galdieria sulphuraria*. Biotechnol. Bioeng., v.90, p.77-84, 2005.

Xiong, W., Li, X. F., Xiang, J. Y., Wu, Q. Y. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbial-diesel production. Appl. Microbiol Biotechnol., v.78, p.29-36, 2008.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Glicose e acetato de sódio foram consumidos pela *C. vulgaris* em condições de heterotrofia. Suas concentrações iniciais no meio influenciaram significativamente o rendimento celular e os parâmetros cinéticos dos cultivos, inibindo em concentrações iniciais maiores que 40 e 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e acetato de sódio respectivamente.

Os procedimentos adotados no controle da contaminação foram efetivos para a manutenção da axenia dos cultivos.

Os modelos avaliados apresentaram boa capacidade de descrição dos dados experimentais para todas as concentrações de glicose e acetato avaliadas. Os resultados indicam que a concentração ótima de glicose e acetato para o cultivo heterotrófico da *C. vulgaris* é  $5,8 \pm 0,3$  e  $3,5 \pm 0,2$  g.L<sup>-1</sup> respectivamente.

Foi constatada uma superioridade (maior que 50%) da glicose como substrato em comparação com o acetato de sódio.

Com a batelada alimentada foi alcançado um aumento de 70% na produtividade máxima e uma concentração final de biomassa 2,5 vezes maior do que a melhor concentração celular alcançada em shaker.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros sugere-se o aprimoramento das metodologias desenvolvidas pelo presente trabalho nos seguintes tópicos:

- ✓ Estudo de diferentes fontes de carbono orgânico, tais como sacarose, xilose, maltose e glicerol;
- ✓ Utilização de fontes de carbono presentes em resíduos agroindustriais como substrato para o cultivo heterotrófico de microalgas;
- ✓ Estudo detalhado do processo de acumulação de lipídeos pela microalga, avaliando condições de favorecimento dessa produção;
- ✓ Estudo de aumento de produtividade de biomassa de microalgas por batelada alimentada ou processos contínuos.
- ✓ Otimização do meio de cultivo sintético em função da concentração de sais e relações carbono/nitrogênio e nitrogênio/fósforo;
- ✓ Estudo da influência do pH e controle deste no cultivo heterotrófico de microalgas utilizando acetato de sódio como substrato;
- ✓ Estudo da dependência do teor de lipídeos da biomassa e composição em ácidos graxos pelo tipo e concentração de substrato.
- ✓ Estudo de outras fontes de nitrogênio com finalidade de otimizar o meio de cultura.

## 8. APÊNDICE

### 8.1. Meios de cultivo

Referência	Composição do meio de cultivo (em g.L <sup>-1</sup> )	
	Glicose	Acetato de sódio
Liang <i>et al.</i> (2009)	10,0	10,0
	NaNO <sub>3</sub> (0,25); CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (0,025); MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (0,075); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,075); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,175); NaCl (0,025); Proteose peptone (Difco) (1,0).	
Heredia-Arroyo <i>et al.</i> (2011)	5,0	20,5
	Extrato de levedura (0,5); KNO <sub>3</sub> (1,0); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,075); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1); MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,5); Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (0,0625); FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,01); H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0,00286); MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (0,00181); ZnCl <sub>2</sub> (0,000105); Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (0,000039); CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (0,000079); CoCl <sub>2</sub> (0,000030).	
Perez-Garcia <i>et al.</i> (2011)	21,6	10,0
	NaCl (0,007); CaCl <sub>2</sub> (0,004); MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (0,002); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,0217); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,0085); Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,025); NH <sub>4</sub> Cl (0,191).	
Ogawa e Aiba (1981)	10,0	-
	KNO <sub>3</sub> (1,25); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,25); MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1,25); FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,02); Solução A (1ml/L) que contém em g/L: H <sub>3</sub> B <sub>3</sub> O (2,9); MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (1,81); ZnCl <sub>2</sub> (0,11); CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (0,08); 3(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O.7MoO <sub>3</sub> .4H <sub>2</sub> O (0,018)	-
Yeh <i>et al.</i> (2012)	10,0	13,67
	NaNO <sub>3</sub> (0,75); CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (0,025); MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (0,075); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,075); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,175); NaCl (0,025); FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (5,0x10 <sup>-3</sup> ); ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (2,87x10 <sup>-4</sup> ); CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (0,025);	

MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (1,69x10 <sup>-4</sup> ); H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (6,1x10 <sup>-5</sup> ); CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (2,5x10 <sup>-6</sup> ); (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .7H <sub>2</sub> O (1,24x10 <sup>-6</sup> ).		
Gladue e Maxey, (1994)	-	10,0 (Os autores não descreveram o meio de cultivo utilizado)

## 8.2. Modelos matemáticos

### 8.2.1. Modelo Andrews (Equação)

$$\frac{dY}{dS} = \mu_{\max\_Est} \frac{d}{dS} \left( \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I}} \right) = \frac{\mu_{\max\_Est} K_I (K_I K_S - S^2)}{(K_I K_S + K_I S + S^2)^2}$$

Pois:

$$\frac{dY}{dS} = \mu_{\max\_Est} \frac{d}{dS} \left( \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I}} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = -\mu_{\max\_Est} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I}\right)^2} \frac{d}{dS} \left( 1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = -\mu_{\max\_Est} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I}\right)^2} \left( K_s \frac{d}{dS} \left( \frac{1}{S} \right) + \frac{1}{K_I} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = -\mu_{\max\_Est} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_I}\right)^2} \left( -K_s \frac{1}{S^2} + \frac{1}{K_I} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = -\mu_{\max\_Est} \frac{1}{\frac{1}{S^2} \left( S + K_s + \frac{S^2}{K_I} \right)^2} \frac{1}{S^2} \left( -K_s + \frac{S^2}{K_I} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = \frac{\mu_{\max\_Est} K_I (K_I K_S - S^2)}{(K_I K_S + K_I S + S^2)^2}$$

O ponto de máximo pode ser encontrado por:  $dY/dS = 0$ . Assim,

$$\frac{dY}{dS} = 0 = \frac{\mu_{\max\_Est} K_I (K_I K_S - S^2)}{(K_I K_S + K_I S + S^2)^2}$$

$$S = \sqrt{K_I K_S}$$

$$\mu_{\max\_Real} = \mu_{\max\_Est} \left( \frac{1}{1 + \frac{K_S}{\sqrt{K_I K_S}} + \frac{\sqrt{K_I K_S}}{K_I}} \right)$$

### 8.2.2. Modelo Haldane (Equação)

$$\frac{dY}{dS} = \mu_{\max\_Est} \frac{d}{dS} \left( \frac{1}{1 + \frac{K_S}{K_I} + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_I}} \right) = \frac{\mu_{\max\_Est} K_I (K_I K_S - S^2)}{(K_I + S)^2 (K_S + S)^2}$$

Pois:

$$\frac{dY}{dS} = \mu_{\max\_Est} \frac{d}{dS} \left( \frac{1}{1 + \frac{K_S}{K_I} + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_I}} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = -\mu_{\max\_Est} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_S}{K_I} + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_I}\right)^2} \frac{d}{dS} \left( 1 + \frac{K_S}{K_I} + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_I} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = -\mu_{\max\_Est} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_S}{K_I} + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_I}\right)^2} \left( K_S \frac{d}{dS} \left( \frac{1}{S} \right) + \frac{1}{K_I} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = -\mu_{\max\_Est} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_S}{K_I} + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_I}\right)^2} \left( -K_S \frac{1}{S^2} + \frac{1}{K_I} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = -\mu_{\max\_Est} \frac{1}{\frac{1}{S^2} \left( S + \frac{K_S}{K_I} S + K_S + \frac{S^2}{K_I} \right)^2} \frac{1}{S^2} \left( -K_S + \frac{S^2}{K_I} \right)$$

$$\frac{dY}{dS} = \frac{\mu_{\max\_Est} K_I (K_I K_S - S^2)}{(K_I K_S + K_I S + K_S S + S^2)^2}$$



$$\frac{dY}{dS} = \frac{\mu_{max\_Est} K_I (K_I K_s - S^2)}{(K_I + S)^2 (K_s + S)^2}$$

O ponto de máximo pode ser encontrado por:  $dY/dS = 0$ . Assim,

$$\frac{dY}{dS} = 0 = \frac{\mu_{max\_Est} K_I (K_I K_s - S^2)}{(K_I + S)^2 (K_s + S)^2}$$

$$S = \sqrt{K_I K_s}$$

$$\mu_{\max\_Real} = \mu_{\max\_Est} \left( \frac{1}{1 + \frac{K_s}{K_I} + \frac{K_s}{\sqrt{K_I K_s}} + \frac{\sqrt{K_I K_s}}{K_I}} \right)$$